

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Citooncología Urinaria Como Método de Ayuda
Diagnóstica Precoz de la Hematuria Vesical Enzoótica
Bovina**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Frank Alexander Peredo Arenas

Lima – Perú

2010

A mis padres y hermanos, que están junto a mí desde siempre y
por siempre

Agradecimientos

Al Dr. Chavera por compartir la magia del conocimiento y ser ejemplo de Maestro y buen amigo.

A Pancho, Fiorella, Manuel y Marco por la relación y apoyo incondicional creado entre nosotros.

A los seres especiales: Luis Enrique, Kike, Julio, Edgar, Talia, Katrin, Carlos, Amalia, Paola, Erick, Sammy, Kikeretas, Victor, Fernando, Rosa, Gina, Gonzalo, Ángel, Momó, Anne, Arthur, Celine, Fausto, Yaster, Pluplú, Shotzeg, Lorena, Priscilla, Pantera, Cristian, Willy, Henry y demás presentes en esta fase de mi vida.

CONTENIDO

	Pag.
Contenido	ii
Lista de tablas	iv
Lista de imágenes	v
Lista de anexos	viii
Resumen	1
Summary	2
I. INTRODUCCION	3
II.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Sobre el helecho <i>Pteridium aquilinum</i>	6
2.1.1 Clasificación científica	6
2.1.2 Características	7
2.1.3 Variedades	7
2.1.4 Distribución geográfica	7
2.1.5 Toxicidad	8
2.1.5.1 Ptaquilósido	8
2.2 Hematuria Vesical Enzoótica Bovina	10
2.2.1 Factores predisponentes	10
2.2.1.1 Edad y sexo	10
2.2.1.2. Dieta	10
2.2.1.3. Papilomavirus	10
2.2.2 Cuadros de intoxicación	11
2.2.2.1 Intoxicación aguda	11
2.2.2.2 Intoxicación crónica	12
2.2.3 Lesiones vesicales	12
2.3 Patogénesis	13

2.4 Respuesta inmune	14
2.5 Citooncología urinaria	15
2.6 Control	20
2.7 Salud pública	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Materiales	21
3.2 Método experimental	22
3.2.1 Lugar de ejecución	22
3.2.2 Animales	23
3.2.3 Toma de muestra de orina	24
3.2.4 Preparación, procesamiento de las muestras	26
3.2.5 Coloración de láminas	27
3.2.6 Lectura de láminas y evaluación microscópica	28
IV. RESULTADOS	29
4.1 Descripción microscópica y diagnostico citooncológico	29
4.2. Frecuencia de positividad a HVEB y tipos de células encontradas	37
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII.BIBLIOGRAFIA	45

Lista de tablas

	Pag.
Tabla 1. Frecuencia de diagnósticos positivos a HVEB utilizando citooncología urinaria. Lima. 2010.	37
Tabla 2. Tipos celulares a evaluar en un estudio citooncológico. Lima. 2010	38
Tabla 3. Presencia de glóbulos rojos en las muestras diagnosticadas positivas a HVEB mediante citooncología urinaria. Lima. 2010	38

Lista de imágenes

	Pag.
Imagen 1. Pteridium aquilinum. 2008.	6
Imagen 2. Reacciones del Ptaquilósido en medios alcalinos: 1.ptaquilosido. 2. ptaquilosin. 3. ptaquilosido activado (dienona intermedia). 4. DNA-aducto. Tomado de Shahin <i>et al.</i> (1999).	9
Imagen 3. Sedimento urinario de canino donde se aprecian células uroteliales que varían en tamaño y calidad de tinción de un carcinoma urotelial (Tinción Wright-Giemsa, 160X). Tomado de Cowell (1999).	16
Imagen 4. Sedimento urinario de canino donde se aprecian células epiteliales pleomórficas de un carcinoma urotelial (Tinción Wright-Giemsa, 100X). Tomado de Cowell (1999)	17

Imagen 5. Sedimento urinario de canino donde se aprecia una célula grande, basofílica, que contiene 2 núcleos de un carcinoma urotelial (Tinción Wright-Giemsa, 400X). Tomado de Cowell (1999).	17
Imagen 6. Ultrasonografía vesical donde se aprecia pérdida de continuidad del epitelio (zona anecoica; segmento A-B) de una vaca con HVEB. Tomado de Sandoval <i>et al.</i> (2002).	18
Imagen 7. Ultrasonografía donde las imágenes indicadas por los punteros corresponden a un puntillado ecoico flotando en el lumen vesical compatible con detritus celulares de una vaca con HVEB. Tomado de Sandoval <i>et al.</i> (2002).	19
Imagen 8. Sedimento urinario de canino donde se aprecian células de citoplasma basofílico y con variable relación núcleo/ citoplasma (Tinción Diff Quik, 10X). Tomado de Rebard (1978).	19
Imagen 9. Vacas pastoreando entre brotes de Pa (flechas rojas) en Oxapampa (Pasco). 2008.	22
Imagen 10. Estimulación de la zona perineal del animal. 2008.	24
Imagen 11. Colección de muestra de orina tras la estimulación de la zona perineal. 2008.	25
Imagen 12. Muestra de orina envasada y rotulada de una vaca con hematuria. 2008.	25
Imagen 13. Rescate del sedimento urinario luego de haber centrifugado la muestra.	26
Imagen 14. Frotis por extensión.	27
Imagen 15. Aplicación de capa de colorante Wright sobre la muestra fija en el portaobjetos.	27
Imagen 16. Homogenización del colorante y el agua destilada soplando suavemente.	28
Imagen 17. Sedimento urinario vacuno hembra donde las flechas rojas señalan células exfoliada uroteliales normales y las flechas verdes señalan grupos de eritrocitos (Tinción Wright 4X).	30
Imagen 18. Sedimento urinario de vacuno hembra donde se aprecian grupos de células epiteliales exfoliadas uroteliales de apariencia normal (Tinción Wright 40X).	30
Imagen 19. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia tres células exfoliadas uroteliales normales (Tinción Wright 40X).	31

Imagen 20. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia una célula urotelial normal caracterizada por presentar núcleo pequeño y citoplasma con tendencia al plegamiento (flecha roja). Además se observan eritrocitos (flechas negras) en el resto del campo (Tinción Wright 100X).	31
Imagen 21. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia una célula urotelial normal caracterizada por presentar relación núcleo/citoplasma incrementada a favor del citoplasma (Tinción Wright 100X).	32
Imagen 22. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia una célula urotelial descamada de núcleo basófilo y citoplasma poligonal. Nótese la relación núcleo/citoplasma incrementada a favor del citoplasma (Tinción Wright 100X).	32
Imagen 23. Sedimento urinario donde se aprecia una célula atípica epitelial con citoplasma levemente basófilo y núcleo irregular de gran tamaño, exfoliada del urotelio de una vaca con HVEB (Tinción Wright 40X).	33
Imagen 24. Sedimento urinario de una vaca con HVEB donde se aprecia una célula epitelial atípica con citoplasma poliédrico, basófilo y aumento de la relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo. Nótese una leve irregularidad nuclear, condensación periférica de la cromatina y una estructura central probablemente nucleolar (Tinción Wright 100X).	34
Imagen 25. Se repite la escena de la imagen 24 para apreciar con mayor detalle el núcleo prominente, la irregularidad de la membrana nuclear (flechas verdes) y la condensación periférica de la cromatina (flecha roja) (Tinción Wright 100X).	34
Imagen 26. Sedimento urinario de una vaca con HVEB donde se aprecia una célula con citoplasma basófilo y con marcado aumento de la relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo. Nótese también la irregularidad nuclear y la condensación periférica de la cromatina (Tinción Wright 100X).	35
Imagen 27. Se observa la célula de la imagen 26 para apreciar con mayor detalle el aumento de la relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo, la irregularidad nuclear (flecha negra) y la condensación periférica de la cromatina (flecha roja) (Tinción Wright 100X).	35
Imagen 28. Sedimento urinario donde la flecha roja señala una célula epitelial atípica de citoplasma levemente basófilo y de gran tamaño nuclear. Exfoliada del urotelio de una vaca con HVEB (Tinción Wright 40X).	36
Imagen 29. Se aprecia con mayor detalle la célula de la imagen 27. Nótese la irregularidad nuclear (flecha roja) (Tinción Wright 100X).	36

Lista de anexos

- Anexo 1.** Total de animales muestreados, animales positivos a Hematuria Vesical Enzoótica Bovina y frecuencia de positividad. Lima. 2010.
- Anexo 2.** Estructura anatómica interior de la vejiga urinaria.
- Anexo 3.** Estructura histológica de la pared vesical urinaria.

RESUMEN

Se realizó el estudio citooncológico, evaluando características de atipicidad y/o tumorales celulares en el sedimento de muestras de orina obtenidas de 210 bovinos hembra criadas de manera extensiva o semiextensiva en la provincia de Oxapampa (Pasco), zona con alta presencia del helecho *Pteridium aquilinum* y de la enfermedad Hematuria Vesical Enzoótica Bovina (HVEB). El proceso de toma, centrifugado, obtención de sedimento urinario, frotís y fijado de la muestra se realizó en campo, mientras que la tinción con colorante Wright y evaluación microscópica se efectuó en Laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. El punto significativo para la detección de animales positivos a la enfermedad fue el hallazgo por evaluación citooncológica urinaria principalmente de células epiteliales atípicas de citoplasma poligonal, basófilo o levemente basófilo con marcado incremento de la relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo, membrana nuclear irregular y condensación de cromatina. Lo que manifiesta el hallazgo y relación a HVEB de células tumorales malignas de blastodermia orientada hacia la epitelial. Además, como dato se reporta el hecho de encontrar mayor cantidad de células uroteliales exfoliadas de apariencia normal, y acompañadas de escaso a leve número de eritrocitos maduros en la mayoría de muestras diagnosticadas positivas. Es así que por medio del presente estudio se comprueba que utilizando como método diagnóstico la citooncología urinaria la frecuencia de presentación de HVEB en la población estudiada es de 64 casos (30.47 %), demostrando la utilidad de la evaluación citooncológica urinaria, especialmente para el diagnóstico de la enfermedad en estadios iniciales. El presente trabajo apoya además el reporte de HVEB en nuestro país y la necesidad de determinar un método diagnóstico precoz y desarrollable en campo para el monitoreo y control de la enfermedad en nuestro medio. Por lo tanto, la citooncología urinaria podría ser la prueba de "oro" estándar para HVEB, necesitando de investigación futura que afine el método y demuestre esta posibilidad diagnóstica.

Palabras clave: Citooncología urinaria, Hematuria Vesical Enzoótica Bovina (HVEB), células atípicas, Bovinos, *Pteridium aquilinum*(Pa).

SUMMARY

A cytooncologic test was performed in order to evaluate tumoral characteristics in the sediment of urine samples obtained from 210 bovine females, extensively or semiextensively bred in the province of Oxapampa (Pasco), area with a high presence of the bracken fern (*Pteridium aquilinum*) and a high prevalence of the Bovine Enzoitic Vesical Haematuria (BEVH) disease. The processes of sample collection, centrifugation, urinary sediment collection, smear and fixation of the sample were performed in the field, while the Wright Test and the microscopic evaluation were done at the Laboratory of Histology, Embryology and Pathology at the School of Veterinary Medicine of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos. The significant point in the detection of animals positive to this disease was mostly the finding of epithelial atypical cells with basophilic and polygonal cytoplasm. And with significant increase of the nuclear-cytoplasm ratio favoring the nucleus. As an additional fact, it has been reported that most of the samples diagnosed as positive to the disease showed an increased number of apparently normal exfoliated urothelial cells accompanied by low number of mature erythrocytes. The present study demonstrated that using urinary cytooncology as a diagnostic method, 64 animals (30.47%) of the studied population show to be positive to the BEVH disease, thus demonstrating the usefulness of urinary cytooncologic evaluation, specially for the diagnose of the disease in its initial phases. In addition, the present work supports the BEVH report in our country and the need to determine a precocious and easy to develop "in the field" diagnostic method that may help monitoring and controlling the disease in our environment. Therefore, urinary cytooncology could become the "golden" standard test to diagnose BEVH, although further research needs to be done in order to demonstrate the usefulness of this diagnostic tool.

Key Words: Urinary Cytooncology, Bovine Enzoitic Vesical Haematuria (BEVH), atypical cells, Bovine, *Pteridium aquilinum* (Pa).

I. INTRODUCCIÓN

La Hematuria Vesical Enzoótica Bovina (HVEB), también conocida como ``enfermedad pancitopénica bovina'' o ``hematuria cística bovina'' (Blood y Radostis, 1992), es un proceso no infeccioso que afecta a bóvidos al pastoreo y circunscrito a zonas geográficas montañosas en suelos ácidos que se encuentran entre 600 y 2000 msnm. Viene a ser la principal forma clínica y a la vez una de las dos expresiones crónicas que posee el síndrome conocido como ``Pteridiosis'' relacionada al consumo continuo y por largos periodos del helecho común, *Pteridium aquilinum* (Pa) (Wiesner, 1973). Actualmente, a este síndrome se le denomina: ``Intoxicación por Ptaquilósido'' (Radostis *et al.*, 2002), en alusión a la principal molécula carcinogénica del Pa.

Esta intoxicación se caracteriza clínicamente por la presencia de sangre total en la orina del animal denominada hematuria que en fases iniciales podría ser imperceptible, sobre todo en el estadio subclínico (microhematuria). Progresivamente, la orina se irá tornando oscura, pasando por emisiones intermitentes de orina enrojecida (macrohematuria), hasta llegar a la eliminación de coágulos de sangre por esta vía, lo cual irá acompañado de disuria y tenesmo. Otros signos importantes son debilidad general, mucosas pálidas, emaciación y caída de la producción de leche (Gonzales *et al.*, 2003).

La HVEB posee como etiología un complejo multifactorial en donde el principal factor es la ingestión continua y por largos periodos de las distintas variedades de Pa (Alonso-Amelot, 1999; Marrero *et al.*, 2001). Otro factor importante es la participación de un virus de la familia Papovaviridae, el cual produce una hiperplasia de las células de transición de la vejiga y forma así una matriz tisular benigna susceptible a carcinogénicos externos, quienes degenerarían el cuadro hacia la malignidad (Fenner *et al.*, 1992; Campo, 1997).

El Pa es una de las cinco malezas más importantes del planeta y a su vez posee una amplia gama de sustancias tóxicas en sus hojas y tallos, destacando un grupo denominado *iludanos*, los cuales poseen gran actividad carcinogénica y mutagénica (Alonso-Amelot, 1999).

La principal molécula carcinogénica del helecho se denomina Ptaquilósido (Pq) y fue descrita por primera vez por Niwa *et al.* (1983). En medios alcalinos, como la mucosa vesical bovina, el Pq se transforma a su forma activa denominada Dienona, la misma que posee actividad sobre el ADN de las células animales, trayendo como consecuencia la alteración de las funciones celulares y la formación de neoplasias (Alonso-Amelot y Avendaño, 2002).

En el Perú, Gonzáles *et al.* (2003) y Herencia (2009) reportaron la enfermedad en bovinos de Oxapampa en la región Pasco, basados en estudios de diagnóstico anatómo-histopatológico *post mortem* y uroanálisis respectivamente. Destacando el desarrollo de neoplasias vesicales de variable clasificación y malignidad, los cuales ubican a la enfermedad en Oxapampa como una de las más severas reportadas a nivel mundial. Esto lo convierte en un problema muy serio para la economía de la región.

La presencia de neoplasias en la vejiga urinaria es una importante característica que apoya el diagnóstico de la HVEB. En los bóvidos la presencia de neoplasias vesicales es rara, más aun en los tipos y estirpes que presenta esta patología, siendo una característica de lesión vesical patognomónica de la enfermedad (Pamukcu, 1974). En HVEB la hematuria se evidencia en un periodo de tiempo mínimo de 2 meses tras empezar el consumo de Pa, La aparición de papilomas en vejiga no se da antes de un año y los carcinomas no se desarrollaron hasta los 2.6 años después de la iniciación de la alimentación con Pa (Pamukcu *et al.*, 1976).

Aún no se ha desarrollado una metodología de diagnóstico clínico adecuada para identificar vacunos positivos a la HVEB en fases iniciales. Pamukcu *et al.* (1966) realizaron uno de los primeros ensayos analizando la orina de vacas enfermas, comprobando que poseían actividad carcinogénica. Sánchez-Villalobos *et al.* (2006) encontraron que la prueba de citología urinaria basada en la detección y conteo de eritrocitos tiene 100% de especificidad, 97.8% de sensibilidad, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 99.5% como método diagnóstico de HVEB.

No existen estudios publicados en Medicina Veterinaria basados en la detección de células atípicas por citología del sedimento urinario con el empleo de colorantes específicos, lo cual ofrecería un panorama interesante para el diagnóstico clínico precoz, como se realiza en Medicina Humana para el diagnóstico de neoplasias vesicales con valores de especificidad entre 87.1% a 100% y sensibilidad entre 40% a 100% (Molina *et al.*, 2003; Aguilera *et al.*, 2005).

El objeto del presente estudio es el de definir una metodología diagnóstica sencilla, económica y no invasiva para HVEB basada en el estudio citooncológico urinario. Que sirva como sistema de monitoreo de animales positivos, debido a que cuando progresa y extiende la enfermedad genera grandes pérdidas económicas en la producción ganadera. Por otro lado, un animal hembra positivo en producción de leche significa un riesgo para la salud pública, ya que se ha comprobado la presencia del Pq del hebrecho en la leche de vacas enfermas (Alonso-Amelot *et al.*, 1996; Pamukcu *et al.*, 1978). Este hecho estrecha relaciones entre la HVEB y el cáncer humano basado además en el hallazgo de que personas que consumen leche o derivados de animales enfermos de HVEB tienen un riesgo de 3,4 y 3,45 veces mayor a desarrollar cáncer de esófago y de estómago, respectivamente (Marliere *et al.*, 1998).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sobre el helecho *Pteridium aquilinum*

2.1.1 Clasificación Científica

Pertenece al reino *Plantae*, phylum *Pteridophyta*, clase *Pteropsida*, orden *Filicales*, familia *Denstaedtiaceae*, género *Pteridium* y especie *Aquilinum* (**Imagen 1**). Dentro de esta clasificación tenemos dos subespecies, *arachnoideum* y *caudatum*, albergando cada una de estas últimas doce y cuatro variedades respectivamente (Sanchez-Villalobos, 2006).



Imagen 1. *Pteridium aquilinum*. 2008.

2.1.2 Características

Es una planta resistente y agresiva en su diseminación en el medio, presenta rizoides y rizomas subterráneos, tallo robusto color marrón y hojas en tercer orden sin flores (Alonso-Amelot, 1999). Su desarrollo comprende cuatro etapas, siendo la primera aquella caracterizada por presentar brotes sin desplegar hojas y por concentrar mayor cantidad de cianuro y Pq (Hirono *et al.*, 1973; Saito *et al.*, 1989). Disminuyendo los niveles de concentración de tóxicos conforme envejece la planta (Sanchez-Villalobos, 2006).

Su reproducción es asexual, siendo a través de esporas contenidas en esporangios ubicados en las frondas. La producción de esporas y diseminación de las mismas kilómetros a la redonda depende directamente de las condiciones climatológicas y ambientales del lugar donde se desarrolla la planta, intensificándose esta característica en primavera y disminuyendo al acercarse el invierno (Page, 1976; Dyer, 1989; Wynn *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 1999).

2.1.3 Variedades

Entre las dos subespecies *caudatum* y *arachnoideum* albergan 16 variedades del helecho. La variedad *arachnoideum* es grande, alcanzando incluso los dos metros, y sus hojas presentan la característica de dirigirse perpendicularmente al eje central de la planta. La variedad *caudatum* es más pequeña y sus hojas se dirigen anguladamente hacia adelante respecto al eje central de la planta. (Alonso-Amelot, 1999).

2.1.4 Distribución geográfica

El Pa está presente en todos los continentes del mundo, con excepción de la Antártida. Es considerada dentro de las cinco principales malezas del planeta (Villalobos *et al.*, 1990).

El Pa se encuentra en regiones cálido/templadas entre 600 y 2000 msnm. Estas regiones son montañosas, sombreadas y húmedas, como la selva alta de nuestro país (Gonzales *et al.*, 2003).

El Pa tiene la peculiaridad de desarrollarse en suelos ácidos, arenosos, bajo en nutrientes, calcio y fósforo, e invadir terrenos, como por ejemplo bosques después de ser talados o quemados (Schneider, 2004).

2.1.5 Toxicidad

El Pq es el principal carcinógeno de entre 100 metabolitos aislados a partir del Pa, esto debido a la capacidad de inducir la formación de tumores en la vejiga urinaria de bovinos (Gonzales *et al.*, 2003). Sin embargo, otros metabolitos como quercetina y tiamina también han manifestado a nivel vesical efectos carcinogénicos y mutagénicos (Evans *et al.*, 1963; Evans, 1976).

El efecto carcinogénico del Pa en distintas especies animales, se ha manifestado debido al consumo directo de rizomas en extractos vegetales (Tokarnia y Dobereiner, 2000), inhalación de esporas (Sim y Se *et al.*, 2000) y la administración oral de la planta joven (Hirono *et al.*, 1984).

2.1.5.1 Ptaquilósido

Fue aislado por primera vez en 1983 y descrito como un potente carcinógeno radiomimético genotóxico (Niwa *et al.*, 1983). Se encuentra en mayor concentración en la variedad *caudatum* comparado con la variedad *arachnoideum* (Alonso-Amelot, 1999).

El Pq es un glucósido sesquiterpeno con anillo ciclopropano capaz de inducir clastogénesis, actividad mutagénica y carcinogénica en cultivos celulares (Hirono *et al.*, 1984; Smith, 1997; Carvalho *et al.*, 2006). Bajo condiciones alcalinas el Pq y su aglicona ptaquilosin se convierten en dienona inestable, siendo ésta última altamente reactiva con el ADN nuclear celular (Shahin *et al.*, 1999) (**Imagen 2**).

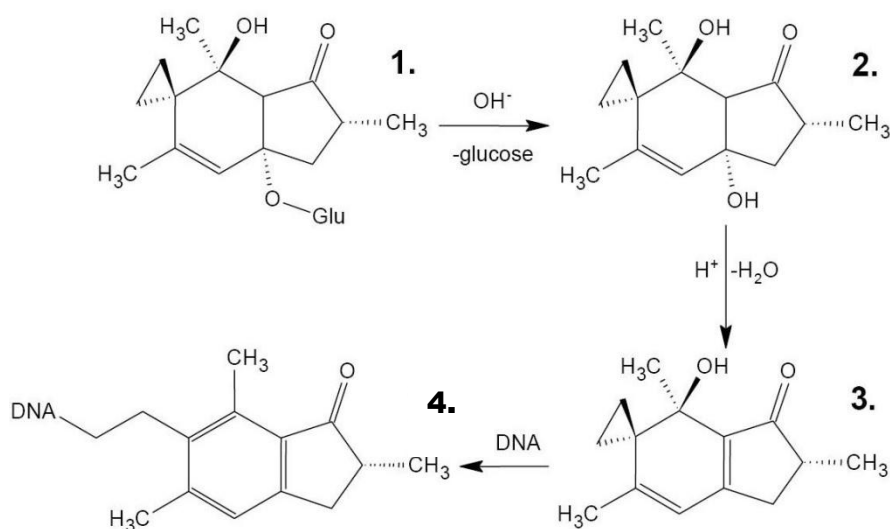


Imagen 2. Reacciones del Ptaquilósido en medios alcalinos: 1.ptaquilosido. 2. ptaquilosin. 3. ptaquilosido activado (dienona intermedia). 4. DNA-aducto. Tomado de Shahin *et al.* (1999).

La dienona inestable debido a su carácter electrofílico reacciona rápidamente con aminoácidos, nucleósidos y nucleótidos (Ojika *et al.*; 1987), formando uniones covalentes con el ADN y causando la ruptura de sus cadenas.

Forma aductos de residuos de adenina y guanina provocando así la ruptura de la base de adenina en el codón 61 (Ojika *et al.*, 1989) y finalmente se depurina y causa error en la síntesis de DNA originando la formación de neoplasias (Prakash *et al.*, 1996).

2.2 Hematuria Vesical Enzoótica Bovina

2.2.1 Factores predisponentes

Sanchez-Villalobos (2006) considera dentro de esta categoría la edad y el sexo asociada al tiempo de intoxicación con Pa, la dieta, características propias de la planta y medio ambientales (Peuroi *et al.*, 1995) y la asociación al Papilomavirus (Lioi *et al.*, 2004).

2.2.1.1 Edad y sexo

Se reportó en vacas con edades entre uno y doce años alimentadas continuamente con *Pteridium aquilinum* sp y debido a su permanencia de tiempo en producción extensiva (Pamukcu *et al.*, 1967; Sanchez-Villalobos, 2006).

2.2.1.2 Dieta

La dieta forrajera propia de la especie bovina, incide directamente en el pH alcalino de la orina (7,5 - 8,5) y saliva (8,1 - 8,2), propiciándose la transformación del Pq en dienona reactiva promotora de carcinogénesis (Van de Hoeven *et al.*, 1983; Potter y Baird, 2000)

2.2.1.3 Papilomavirus

Existe sinergismo entre los Papilomavirus tipo 1, tipo 2 y tipo 4 (PVB-1, PVB-2, PVB-4 respectivamente) y los compuestos tóxicos del Helecho común como el Pq, favoreciéndose así la carcinogénesis a nivel de la vejiga de bovinos (Lioi *et al.*, 2004). La inmunosupresión producida por el consumo de Pa favorece la infección de virus oncógenicos papilomavirus en el epitelio y mucosa vesical del animal, produciendo lesiones proliferativas iniciales con tendencia al desarrollo de carcinomas (Campo *et al.*, 1994).

Los PVB-1, PVB-2 y PVB-4 expresan marcadores (oncoproteínas E5, E6, E7 y uroplaquinas) en las células neoplásicas de animales intoxicados con Pa (Borzacchiello *et al.*, 2009). Además, parece existir una relación entre la región infectada del animal y el tipo de papilomavirus bovino involucrado. Así, el PVB-2 permite la acción mutagénica del Pq y la expresión de la oncoproteína E5, que junto a E6 y E7 incrementan la transformación del virus e infectan la vejiga urinaria (Borzacchiello *et al.*, 2003). El PVB-2 puede mantenerse latente por un año hasta que se expresen los oncogenes virales para el desarrollo de neoplasias uroteliales (Borzacchiello *et al.*, 2009).

2.2.2 Cuadros de Intoxicación

Los signos clínicos manifestados en el animal varían según el grado de intoxicación con Pa. Clínicamente se ha descrito bovinos con lesiones en el urotelio vesical sin presencia de hematuria, mientras que otros presentaron hematuria sin mostrar lesiones macroscópicas en la vejiga (Moulton, 1990).

2.2.2.1 Intoxicación aguda

En este caso los signos clínicos resaltantes son la no ganancia de peso o pérdida de condición corporal, en el caso de hembras baja producción lechera, hematuria e infecciones secundarias agravadas por la inmunosupresión del animal (Dobereiner *et al.*, 1967; Evans, 1968).

Las pruebas complementarias como hemograma, pruebas bioquímicas y estudios histopatológicos, indican pancitopenia como primer signo de intoxicación aguda, depleción linfóide en el bazo y disminución de la actividad de la médula ósea indicando anemia aplásica (Tokarnia y Dobereiner, 2000). Una de las consecuencias es el síndrome hemorrágico en diversos órganos, tejidos y mucosas, debido al aumento del tiempo de coagulación (Pamukcu y Price, 1969; Pamukcu *et al.*, 1972; Hirono *et al.*, 1984).

Pruebas de uroanálisis y citología urinaria, indicaron aumento del número de glóbulos rojos en las muestras de vacas con HVEB (Herencia, 2009)

2.2.2.2 Intoxicación crónica

La hematuria continúa e incluso se intensifica, conllevando a estado de anemia hemorrágica, mucosas pálidas e infecciones secundarias. A nivel sanguíneo, continúa la anemia aplásica microcítica debido a la disminución de la actividad de la médula ósea. Las pruebas bioquímicas sanguíneas de los bovinos indican hipoproteinemia, hipoalbuminemia, aumento de BUN (nitrógeno ureico en sangre), hipocalcemia e hipofosfatemia y en el uroanálisis se observa proteinuria, hematuria, leucocituria, nitritos positivos, bacterias y células transicionales (Sánchez *et al.*, 2006; Herencia 2009).

La acumulación prolongada del tóxico en el organismo animal junto a otros factores predisponentes, propician carcinogénesis a nivel de la pared vesical urinaria. El desarrollo de neoplasias en la vejiga intensifica radicalmente la hematuria, manifestándose así la enfermedad conocida como Hematuria Vesical Enzoótica Bovina (Marrero *et al.*, 2001).

2.2.3 Lesiones vesicales

La vejiga es el principal órgano afectado en HVEB, describiéndose los primeros cambios macroscópicos de éste órgano tales como congestión, edema y engrosamiento de la pared (Sardon *et al.*, 2005). El progreso de éstas lesiones dan lugar a una variedad de neoplasias epiteliales y mesenquimales, algunas con formaciones nódulo-vasculares ulceradas y/o procesos proliferativos polipoides (Gonzáles *et al.*, 2003).

Las neoplasias en vejiga pueden ser de un solo tipo celular o de varios tipos celulares originando en la mayoría de los casos crónicos neoplasias mixtas (Gonzales *et al.*, 2003). Se desarrollan en las paredes ventrales y laterales del fundus o del triangulo vesical, lugares en constante contacto con la orina y con los compuestos tóxicos del Pa (Moulton, 1990).

Las neoplasias epiteliales en vejiga de bovinos son más frecuentes que las neoplasias mesenquimales. Las neoplasias epiteliales comunes son los papilomas y sus variedades tales como papiloma exofítico, papiloma invertido, papiloma con carcinoma de células transicionales y las neoplasias papilares de baja malignidad (Meuten *et al.*, 2004).

Los adenomas, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales y sus variantes tales como micropapilar, variante nidal de Brunn, microcística y carcinoma *in situ*, también se desarrollan con facilidad. Entre las neoplasias mesenquimales se describen hemangioma, hemangiosarcoma, hemangioendotelioma y fibroma (Carvalho *et al.*, 2006), así como, mixosarcoma, rabdomiosarcoma, leiomiosarcoma, hemangiopericitoma maligno y carcinoma tubular (González *et al.*, 2003).

2.3 Patogénesis

El factor detonante para el desarrollo de neoplasias en la vejiga urinaria es la exposición directa del urotelio con el carcinógeno presente en la orina (Boyland *et al.*, 1957). Estos carcinógenos por ser reactivos del ADN producen hiperplasia y mitosis celular, desarrollando neoplasias (Cohen y Ellwein, 1990). Se debe considerar también el hecho de que el pH es capaz de alterar la ionización de algunos compuestos químicos e incorporarlos en las células del urotelio, y junto a proteínas modificar así la disponibilidad del carcinógeno en la orina (Cohen *et al.*, 2007).

El Pq contenido en el Pa atraviesa la barrera fisiológica digestiva del animal e ingresa al torrente sanguíneo, allí se distribuye a los tejidos del animal, incluyendo la vejiga (Alonso-Amelot, 1999). El pH alcalino de la orina propicia la conversión del Ptaquilósido en dienona, éste último viene a ser el verdadero compuesto tóxico (Saito *et al.*, 1989). A nivel celular, la dienona traspasa la membrana celular y nuclear, se une químicamente a proteínas con terminal amino expuesto como el ADN e interacciona con el átomo de nitrógeno de una base adenina, aparentemente mediado por la activación del gen H-ras (Matoba *et al.*, 1987; Alonso-Amelot y Avendaño, 2001). Éste proceso afecta la regulación de la apoptosis en células defectuosas o neoplásicas a cargo del gen p53, provocando un excesivo aumento de su expresión en células tumorales (Santos *et al.*, 1992; Alonso-Amelot y Avendaño, 2001; Hopman *et al.*, 2002).

La sobreexpresión de p53 alterado conduce a la inestabilidad genética celular, produciendo mutaciones y aneuploidia del ADN, pérdida del cromosoma 9 y frecuentemente combinado con deleciones homocigóticas de 9p21 (Wagner *et al.*, 1995; Hopman *et al.*, 2002).

La pérdida del cromosoma 9 es una alteración genómica frecuente en el cáncer de vejiga y detectada en lesiones como hiperplasia y carcinoma *in situ*. Considerándolas precursores de los carcinomas papilares y carcinomas invasivos respectivamente (Baud *et al.*, 1998; Cordon-Cardo, 1998; Hartmann *et al.*, 1999).

El mismo proceso de inestabilidad cromosómica y como consecuencia presentación de aberraciones estructurales en los cromosomas se ha descrito en un gran número de bovinos con HVEB, como por ejemplo aneuploidismo, cromatinas y cromosomas rotos (Lioi *et al.*, 2004; Peretti *et al.*, 2007). La acumulación de las alteraciones en el ADN resultan en inestabilidad genómica conduciendo a la oncogénesis celular (Kastan y Bartek, 2004).

La activación del oncogen H-ras, produce errores durante la síntesis del ADN y ocasiona mutaciones somáticas (Prakash *et al.*, 1996; Nagorny *et al.*, 1999). Las mutaciones producidas por H-ras han sido asociadas con neoplasias de vejiga urinaria, incluso en vejigas con cistitis crónica de animales expuestos al consumo del *Pteridium aquilinum* (Peretti *et al.*, 2007).

2.4 Respuesta inmune

Experimentos realizados en ratones demostraron que la actividad inmunosupresora del Pa afecta a células de la respuesta inmunitaria antitumoral, tales como los linfocitos T, T colaboradores y NK; sin embargo, la inmunidad humoral compuesta por los Linfocitos B y macrófagos, no se vio afectada (Oliveira *et al.*, 2009)

Generalmente los tumores son débilmente inmunógenos; sin embargo, los tumores que provocan una fuerte reacción inmunitaria son aquellos que expresan antígenos extraños o formas mutadas de proteínas propias. Las células que intervienen en la destrucción celular tumoral son los linfocitos T citotóxicos, NK y eventualmente macrófagos activados (Abbas *et al.*, 2002).

La respuesta inmune antitumoral empieza cuando los CD4 se unen a los antígenos tumorales y secretan citoquinas, en este caso TNF e IFN gamma para activar macrófagos que a su vez secretan IFN gamma e IL12 para presentar el antígeno tumoral a los CD8; éstos últimos se encargan de la muerte celular tumoral. Las citoquinas IL2, IL4, IL12 y el IFN gamma inducen a la acción citotóxica de las células NK sobre ciertas líneas celulares tumorales hematopoyéticas (Abbas *et al.*, 2002).

La acción de NK es por medio de perforinas y las citocinas TNF-a y TNF-b; y además por una proteasa llamada fragmentina capaz de inducir fragmentación del DNA y apoptosis de células blanco (Tizard, 2000).

Los procesos inmunológicos antitumorales se ven disminuidos en los animales con HVEB por los efectos negativos sobre NK y su repercusión sobre linfocitos CD4, CD8 y células dendríticas. Viéndose favorecida la evolución de neoplasias en estos animales (Oliveira *et al.*, 2009).

2.5 Citooncología urinaria

La citología es el estudio de células individuales que tiene el propósito de detectar anomalías morfológicas de las células examinadas que provienen de la descamación de superficies epiteliales, de líquidos corporales o se obtienen por aspiración con aguja fina (Koss, 1992).

El desarrollo de la citología como campo de estudio de la medicina, necesitó dos condiciones: el concepto de célula y la invención del microscopio. A pesar de que la invención del microscopio data del siglo XVI, el concepto de célula logró aceptación hasta el siglo XVIII por lo que la citología como herramienta diagnóstica tiene sus comienzos a partir del siglo XIX (Varela, 2005).

En el diagnóstico citológico del cáncer, una de las contribuciones básicas más importantes fue el reconocimiento del origen epitelial de los carcinomas de piel, mama y útero. Estos aportes marcaron el inicio de la citooncología y permitieron el desarrollo de la citología diagnóstica clínica y la identificación de las lesiones precancerosas (Albujar, 2001)

El fundamento de la citooncología urinaria se basa en que las células que provienen de la pelvis renal, uréteres, vejiga y uretra son arrastradas por la orina y por lo tanto pueden ser observadas en las muestras obtenidas por micción espontánea (Villanova, 1992). Además se sabe que la citología del tracto urinario es importante principalmente en el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias vesicales debido al fenómeno de descamación celular tumoral (Minnassian *et al*, 1994)

La citooncología urinaria es considerada una técnica con alto valor diagnóstico para procesos neoplásicos vesicales en pacientes humanos, el hallazgo citológico que más ayuda en el diagnóstico de las neoplasias es la alteración en la relación núcleo/citoplasma, otorgándosele a este método una sensibilidad del 97%, y, una especificidad del 96%, un valor predictivo positivo 98,5%, y un valor predictivo negativo de 92% en el caso de carcinomas vesicales humanos (García *et al*, 2008).

Cowell (1999) ha descrito la citooncología urinaria como un método de rutina en el diagnóstico de procesos neoplásicos vesicales en el perro y el gato, además menciona para este método la utilización de coloraciones tipo Romanowsky como la tinción Wright, coloración de bajo costo y fácil preparación. Y aunque los detalles del núcleo y nucléolo no se perciben tan bien como en las coloraciones tipo Papanicolaou, suele ser suficiente una coloración tipo Romanowsky para diferenciar un proceso neoplásico mediante los cambios de forma y tamaño celular, así como la alteración en la relación núcleo/citoplasma (**Imágenes 3, 4 y 5**).

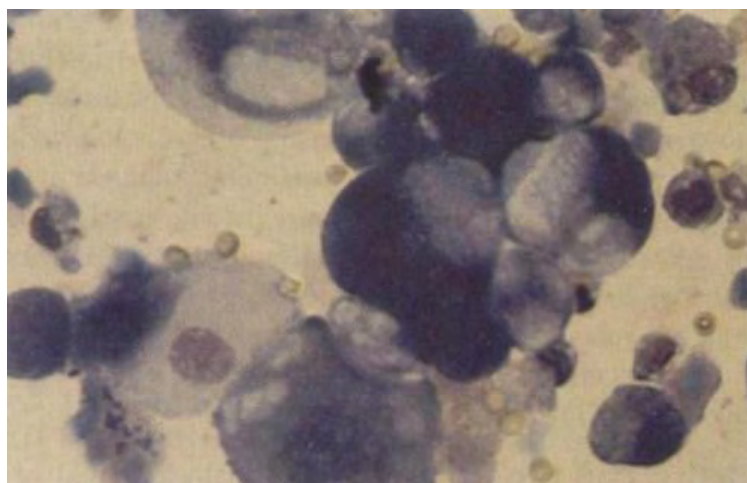


Imagen 3. Sedimento urinario de canino donde se aprecian células uroteliales que varían en tamaño y calidad de tinción de un carcinoma urotelial (Tinción Wright-Giemsa, 160X). Tomado de Cowell (1999).

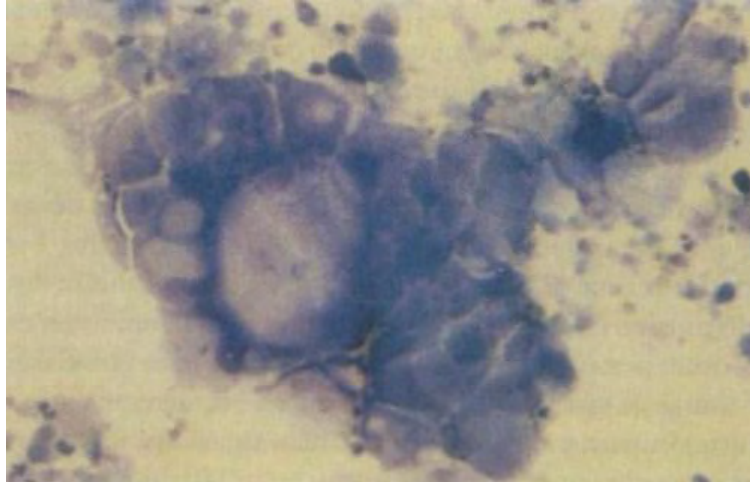


Imagen 4. Sedimento urinario de canino donde se aprecian células epiteliales pleomórficas de un carcinoma urotelial (Tinción Wright-Giemsa, 100X). Tomado de Cowell (1999).

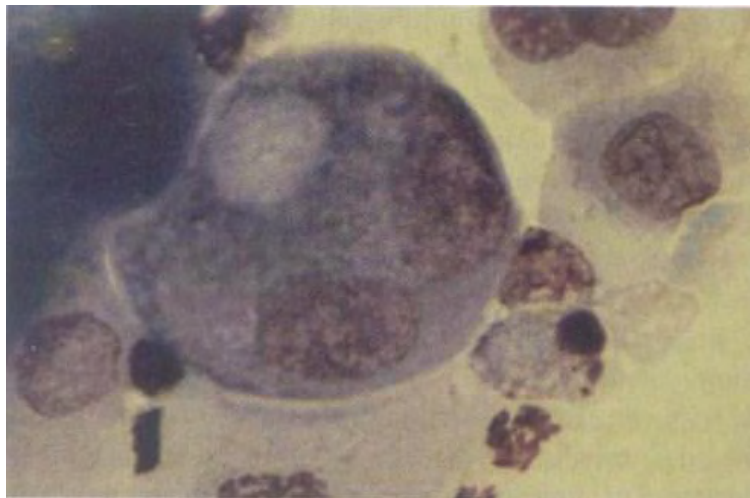


Imagen 5. Sedimento urinario de canino donde se aprecia una célula grande, basofílica, que contiene 2 núcleos de un carcinoma urotelial (Tinción Wright-Giemsa, 400X). Tomado de Cowell (1999).

La evidencia de soluciones de continuidad de la mucosa con pérdida de material epitelial hacia el lumen vesical mediante ultrasonografía de la vejiga urinaria en el 100% de vacas con antecedentes clinicopatológicos de HVEB (Sandoval *et al*, 2002) (**Imágenes 6 y 7**). Permite presumir que es posible el estudio citoncológico del material epitelial vesical exfoliado en la orina mediante urocitología, tal como se describe para el diagnostico de procesos neoplásicos vesicales en otras especies animales domesticas (Rebard, 1978) (**Imagen 8**).

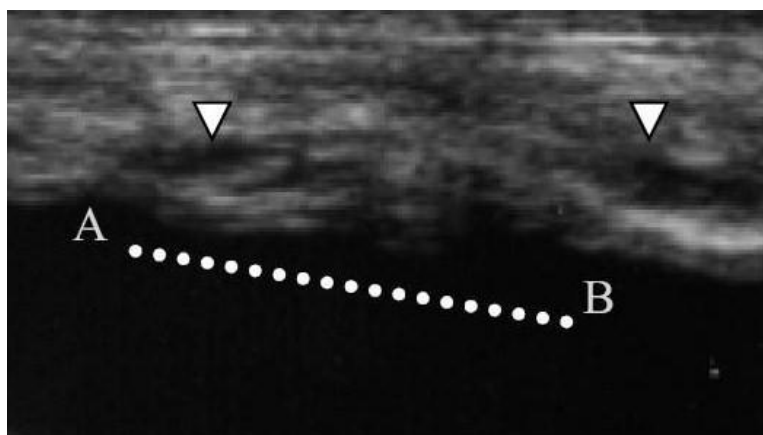


Imagen 6. Ultrasonografía vesical donde se aprecia pérdida de continuidad del epitelio (zona anecoica; segmento A-B) de una vaca con HVEB. Tomado de Sandoval *et al* (2002).

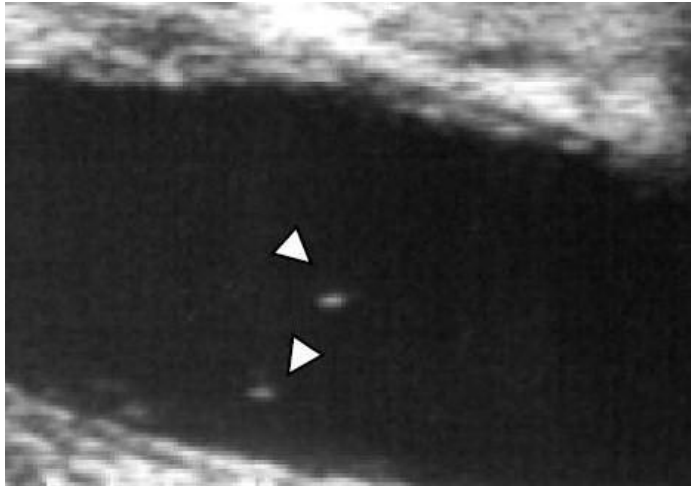


Imagen 7. Ultrasonografía donde las imágenes indicadas por los punteros corresponden a un puntillado ecoico flotando en el lumen vesical compatible con detritus celulares de una vaca con HVEB. Tomado de Sandoval *et al* (2002).

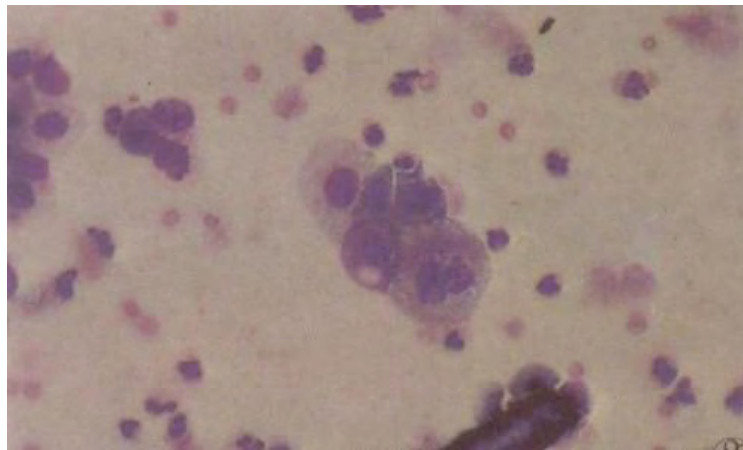


Imagen 8. Sedimento urinario de canino donde se aprecian células de citoplasma basofílico y con variable relación núcleo/citoplasma (Tinción Diff Quik, 10X). Tomado de Rebard (1978).

2.6 Control

Los estudios que se han hecho teniendo como propósito controlar el crecimiento del Pa en los terrenos de pastoreo han determinado que la única manera de hacerlo es erradicándola (Sánchez *et al.*, 2003).

Se propone también la suplementación mineral y nitrogenada de la dieta del ganado para garantizar sus requerimientos nutricionales y palear la necesidad de buscar acceso a los bosques de la montaña en época de seca para alimentarse del Pa. Además, la inclusión de azufre, nitrógeno y aminoácidos azufrados en la dieta podrían contribuir a detoxificar el Pq (Marrero *et al.*, 2001).

2.7 Salud Pública

El hombre se intoxica con el Pa por medio de la inhalación o ingestión de esporas, ingestión directa de la planta e ingestión de leche cruda proveniente de animales con HVEB (Potter y Baird, 2000). Induciendo así el efecto genotóxico y carcinogénico de los metabolitos del Pa en el hombre (Shahin *et al.*, 1999).

La intoxicación por consumo de leche proveniente de bovinos con HVEB, se debe a la alta concentración de Pq, la cual corresponde al 10% de la cantidad ingerida por animal (Alonso-Amelot *et al.*, 1993). Se ha comprobado experimentalmente el desarrollo de neoplasias en roedores que ingirieron leche contaminada con Pq (Pamukcu *et al.*, 1978; Villalobos *et al.*, 1990).

En Costa Rica, Venezuela, Brasil y Japón se comprobado la relación entre la ingesta de Pa y la presencia de cáncer en estómago y esófago de humanos (Villalobos-Salazar, 1985; Marliere *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

- Equipo y material para la recolección y procesamiento de muestras de orina:
 - Envases plásticos con tapa y etiqueta de 100 ml.
 - Pipeta descartable de 5 ml
 - Tubos de ensayo de 5 ml
 - Centrífuga
 - Láminas portaobjetos
 - Albúmina de bovino

- Equipo de laboratorio:
 - Coloración Wright
 - Agua destilada
 - Gotero
 - Manguerilla
 - Permout
 - Láminas cubreobjetos
 - Aceite de inmersión
 - Microscopio óptico de luz marca Leitz
 - Dispositivo de Cámara fotográfica para microscopio óptico marca Leitz
 - Computadora

3.2 Método Experimental

3.2.1 Lugar de Ejecución

La colección, centrifugación y frotis de las muestras urinarias se llevó a cabo en la zona ganadera de Oxapampa (Pasco) donde ha sido reportada la HVEB en el ganado vacuno, la zona tiene una alta presencia de Pa en las áreas de pastoreo, lo que la describe como zona endémica o de riesgo a este proceso (**Imagen 9**).

La coloración y evaluación microscópica se realizó en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM en Lima.



Imagen 9. Vacas pastoreando entre brotes de Pa (flechas rojas) en Oxapampa (Pasco). 2008.

3.2.2 Animales

Se trabajó con 210 vacunos hembras debido a que este grupo en comparación a los machos es criado de forma extensiva por largos periodos de tiempo y por lo mismo es más expuesto al consumo de Pa (Pamukcu *et al.*, 1967; Sanchez-Villalobos, 2006). Estos animales a su vez fueron mayores a 15 meses de edad, seleccionados así también por lo anteriormente mencionado y estaban expuestos al consumo de las frondas de Pa y habitaban en fincas con historia de HVEB. A su vez fueron animales que al examen clínico se consideraron positivos a HVEB por presentar orina de color rojiza, caquetsia y/o mucosas pálidas (todos estos son signos clínicos descritos por Radostits *et al.* (2002) para animales con HVEB), y además aparentemente no presentaban otra enfermedad.

Se Calculó el tamaño de la muestra haciendo uso de la fórmula para estimar una proporción (Fernández, 1996):

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2}$$

n = tamaño de la muestra requerido

t = nivel de confianza de 95%(1.96)

p = prevalencia estimada de 16.3%(0.163) *

m = error estándar de 5%(0.05)

* Prevalencia de HVEB en el estado de Mérida, Venezuela (Sanchez-Villalobos *et al.*, 2006). Utilizada en este caso debido a que no existen datos de prevalencia de HVEB para ninguna región del Perú

$$209.64 = \frac{1.96^2 \times 0.163(1-0.163)}{0.05^2}$$

3.2.3 Toma de muestras de orina

En las fincas de donde provienen los animales seleccionados se constató la presencia de Pa en la zona de pastoreo y se realizó una evaluación clínica de los vacunos del hato para descartar la presencia de otras enfermedades. Luego se obtuvo muestras individuales de orina, estimulando la micción mediante masaje manual entre 5 y 10 minutos aproximadamente de la zona perineal (Sánchez-Villalobos *et al.*, 2006) (**Imágenes 10 y 11**).

Las muestras se colectaron en envases plásticos de 100 ml, de boca ancha y tapa hermética y debidamente rotulados (**Imagen 12**).



Imagen 10. Estimulación de la zona perineal del animal. 2008.



Imagen 11. Colección de muestra de orina tras la estimulación de la zona perineal. 2008.



Imagen 12. Muestra de orina envasada y rotulada de una vaca con hematuria. 2008.

3.2.4 Preparación, procesamiento de las muestras

Según la técnica descrita por Benjamin (1984), un volumen de 5 ml de la muestra de orina fue centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó, dejando aproximadamente 0.3 ml de orina, que resbaló sobre las paredes del tubo y permitió resuspender el sedimento con la ayuda de una pipeta y, con esta última, colocar una gota sobre la lámina portaobjetos donde se realizó el frotis por extensión y seguidamente el secado y fijado en la lámina con albúmina de bovino para proteger las células exfoliadas (**Imágenes 13 y 14**).



Imagen 13. Rescate del sedimento urinario luego de haber centrifugado la muestra.

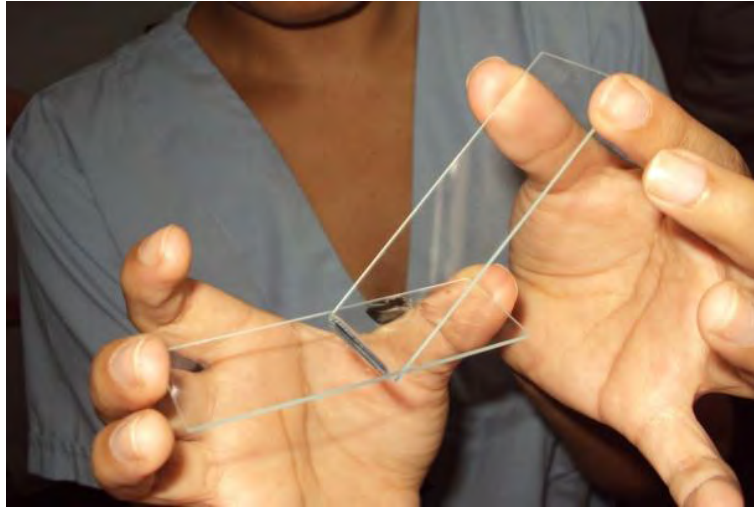


Imagen 14. Frotis por extensión.

3.2.5 Coloración de láminas

Posteriormente y según la técnica descrita por Benjamin (1984), se coloreó la muestra aplicando una capa de tinción Wright por 3 minutos sobre el portaobjetos que lleva la muestra fijada y luego se añadió 15 gotas de agua destilada y se homogenizaron ambas sustancias soplando aire suavemente con ayuda de una manguerilla (**Imágenes 15 y 16**). Después de 5 minutos se lavó la muestra con agua. Seguidamente se montó la lámina con Permount y un cubre objeto.



Imagen 15. Aplicación de capa de colorante Wright sobre la muestra fija en el portaobjetos.



Imagen 16. Homogenización del colorante y el agua destilada soplando suavemente.

3.2.6 Lectura de láminas y evaluación microscópica

La lámina se llevó al microscopio óptico de luz y fue observada con objetivo de 5X, 10X, 40X y 100x recorriendo todo el campo en cada caso para su evaluación citopatológica e interpretación de los hallazgos microscópicos (Cowell, 1999). Las lecturas de las láminas fueron clasificadas en dos grupos:

- Positivas a HVEB: citologías donde encontramos células con características atípicas o también denominadas tumorales o neoplásicas, según la clasificación de la OMS (Meuten *et al.*, 1994: WHO histological classification of tumours of the urinary tract).
- Negativas a HVEB: citologías donde no encontramos células con características atípicas o también denominadas tumorales o neoplásicas.

IV. RESULTADOS

4.1. Descripción microscópica y diagnóstico citoncológico

A pesar de que la mayoría de muestras resultaron sobre coloreadas por causas no determinadas. Sin embargo independientemente a esto si se pudo evaluar las características celulares, describiéndose como hallazgo la presencia en el sedimento urinario de células epiteliales normales caracterizadas por presentar citoplasma levemente basófilo, morfología poligonal y relación núcleo/citoplasma incrementada a favor del citoplasma, dando una relación normal. Además, algunas de estas células tienden a corrugarse o plegarse. Por estas características citológicas es probable que su origen blastodérmico sea epitelial, producto de la descamación del urotelio vesical. Además fue posible identificar glóbulos rojos, bacterias, detritus celulares y células inflamatorias (**Imágenes 17, 18, 19, 20, 21 y 22**).

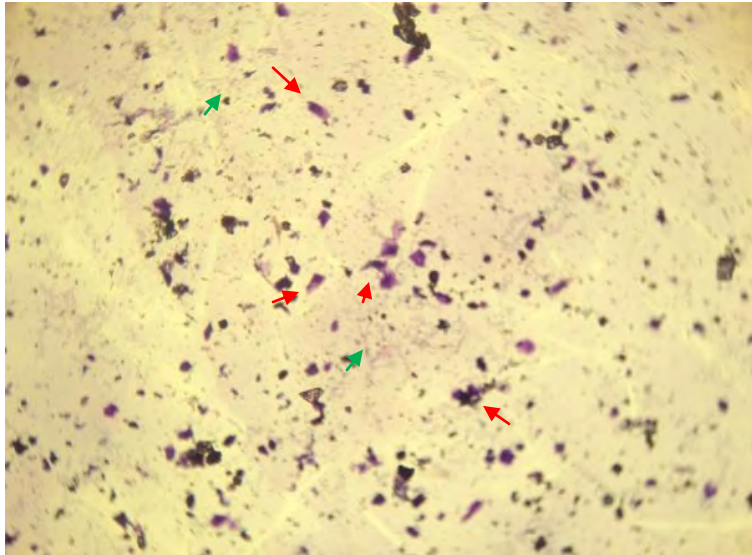


Imagen 17. Sedimento urinario de vacuno hembra donde las flechas rojas señalan células exfoliadas uroteliales normales y las flechas verdes señalan grupos de eritrocitos (Tinción Wright 4X).

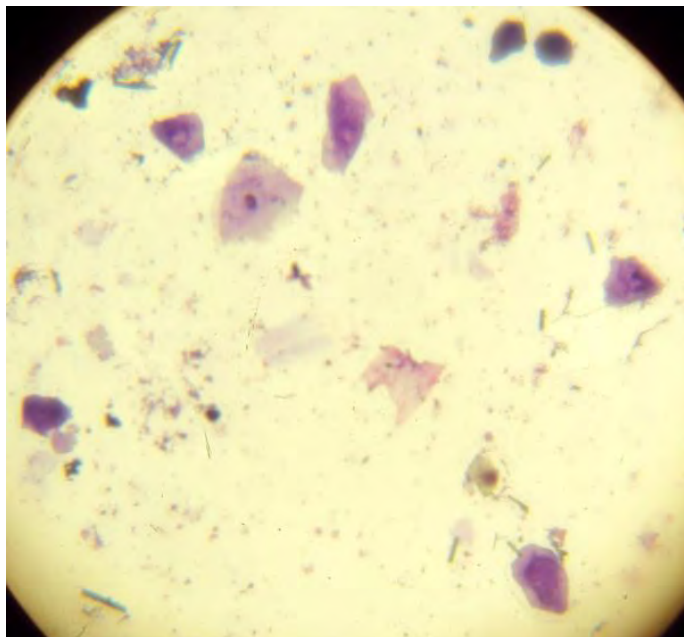


Imagen 18. Sedimento urinario de vacuno hembra donde se aprecian grupos de células epiteliales exfoliadas uroteliales de apariencia normal (Tinción Wright 40X).

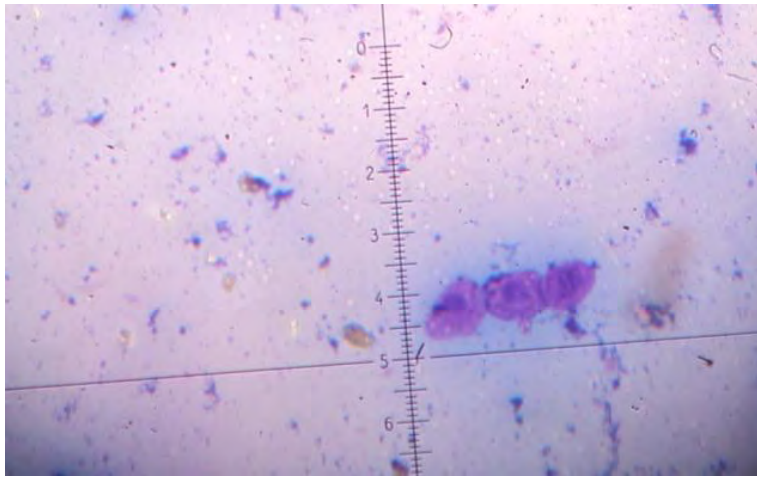


Imagen 19. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia tres células exfoliadas uroteliales normales (Tinción Wright 40X).

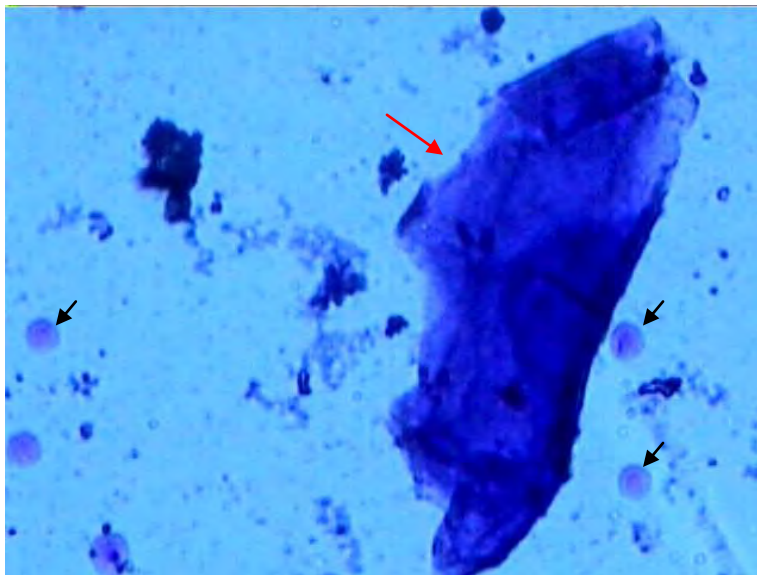


Imagen 20. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia una célula urotelial normal caracterizada por presentar núcleo pequeño y citoplasma con tendencia al plegamiento (flecha roja). Además se observan eritrocitos (flechas negras) en el resto del campo (Tinción Wright 100X).

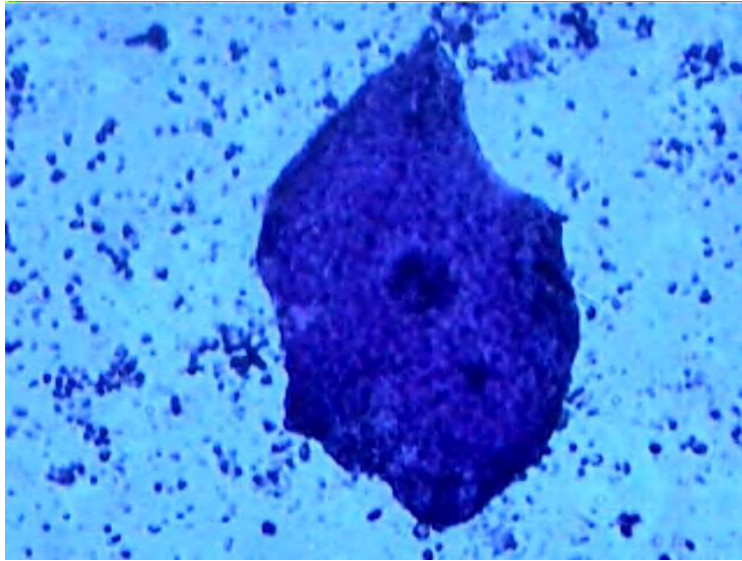


Imagen 21. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia una célula urotelial normal caracterizada por presentar relación núcleo/citoplasma incrementada a favor del citoplasma (Tinción Wright 100X).

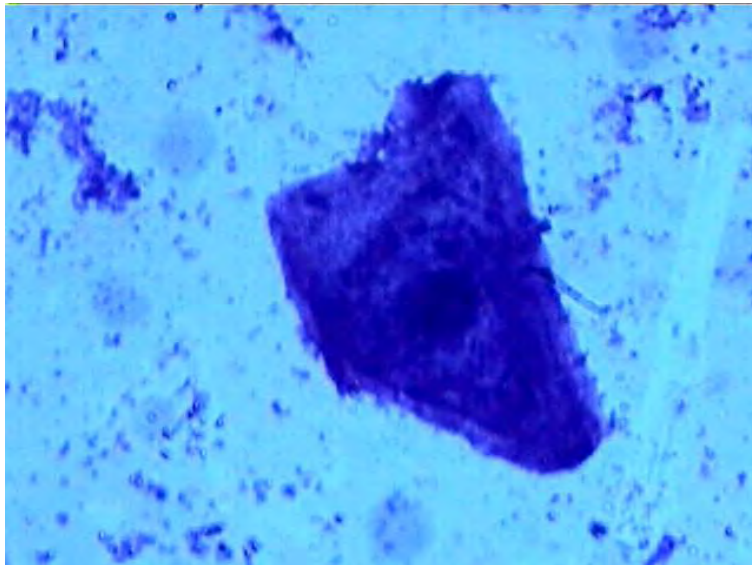


Imagen 22. Sedimento urinario de una vaca donde se aprecia una célula urotelial descamada de núcleo basófilo y citoplasma poligonal. Nótese la relación núcleo/citoplasma incrementada a favor del citoplasma (Tinción Wright 100X).

Se diagnosticó como muestras positivas aquellas en las cuales se identificaron 1 o más células tumorales o también llamadas atípicas, caracterizadas por presentar los siguientes hallazgos citomorfológicos: citoplasma poligonal, basófilo o levemente basófilo, relación núcleo/citoplasma incrementada de 2 a 3 veces a 1 a favor del núcleo, irregularidad de la membrana nuclear y condensación de cromatina (**Imagen 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29**).

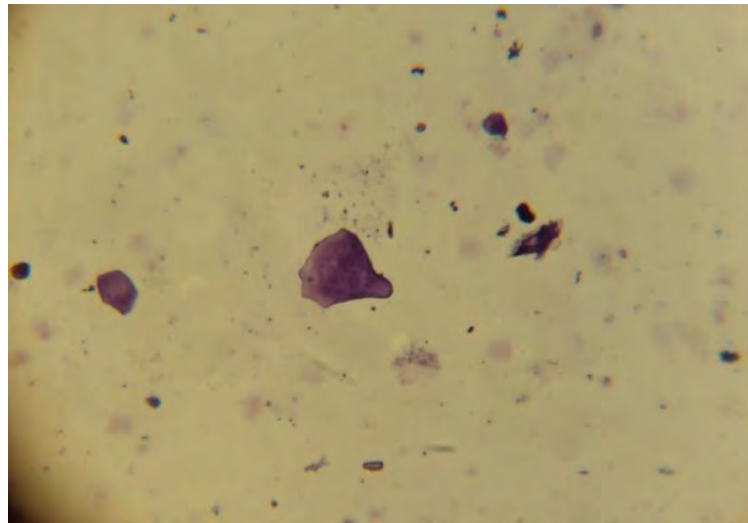


Imagen 23. Sedimento urinario donde se aprecia una célula atípica epitelial con citoplasma levemente basófilo y núcleo irregular de gran tamaño exfoliada del urotelio de una vaca con HVEB (Tinción Wright 40X).

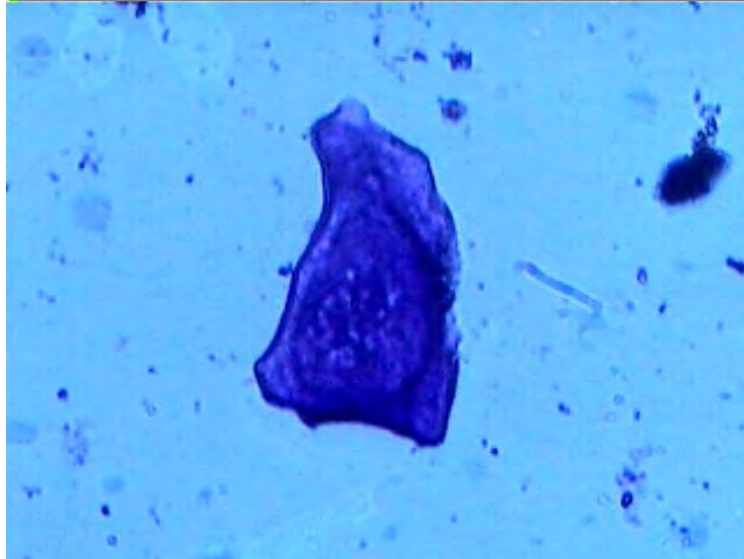


Imagen 24. Sedimento urinario de una vaca con HVEB donde se aprecia una célula epitelial atípica con citoplasma poliédrico, basófilo y aumento de la relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo. Nótese una leve irregularidad nuclear, condensación periférica de la cromatina y una estructura central probablemente nucleolar (Tinción Wright 100X).

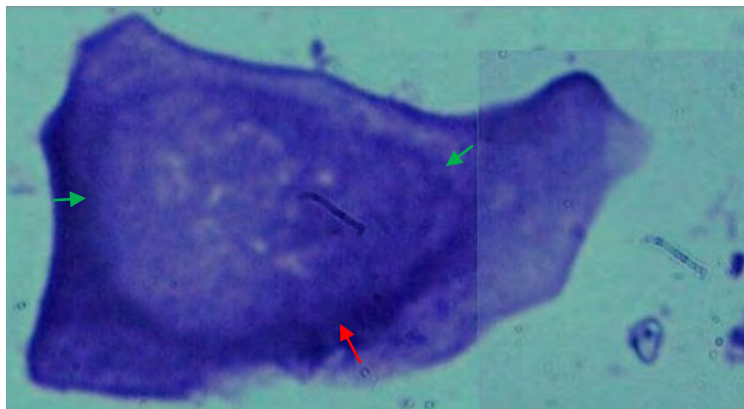


Imagen 25. Se repite la escena de la imagen 24 para apreciar con mayor detalle el núcleo prominente, la irregularidad de la membrana nuclear (flechas verdes) y la condensación periférica de la cromatina (flecha roja) (Tinción Wright 100X).

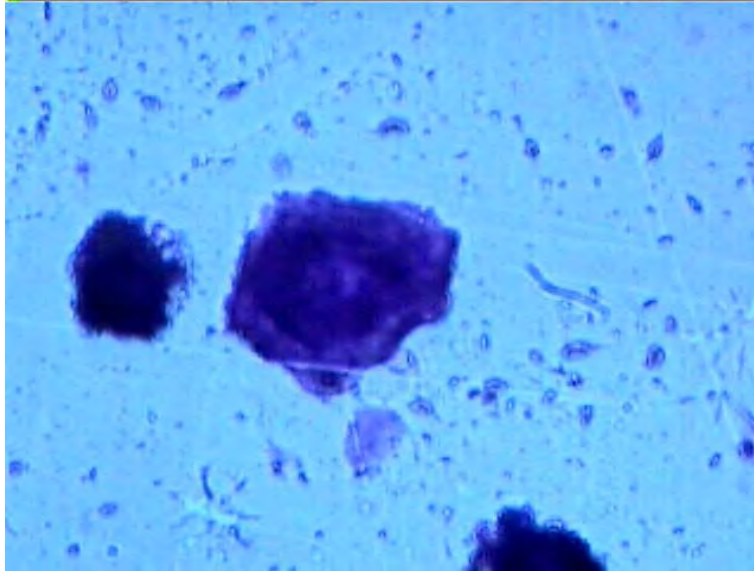


Imagen 26. Sedimento urinario de una vaca con HVEB donde se aprecia una célula con citoplasma basófilo y con marcado aumento de la relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo. Nótese también la irregularidad nuclear y la condensación periférica de la cromatina (Tinción Wright 100X).

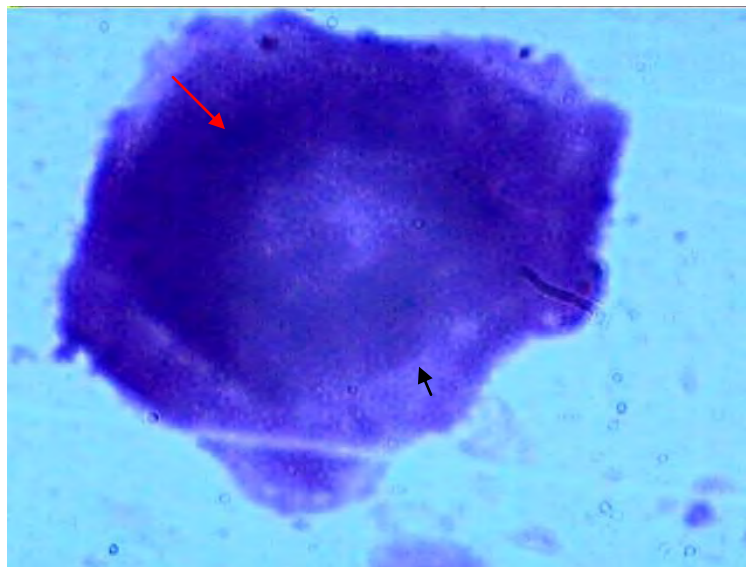


Imagen 27. Se observa la célula de la imagen 26 para apreciar con mayor detalle el aumento de la relación núcleo/citoplasma a favor del núcleo, la irregularidad nuclear (flecha negra) y la condensación periférica de la cromatina (flecha roja) (Tinción Wright 100X).

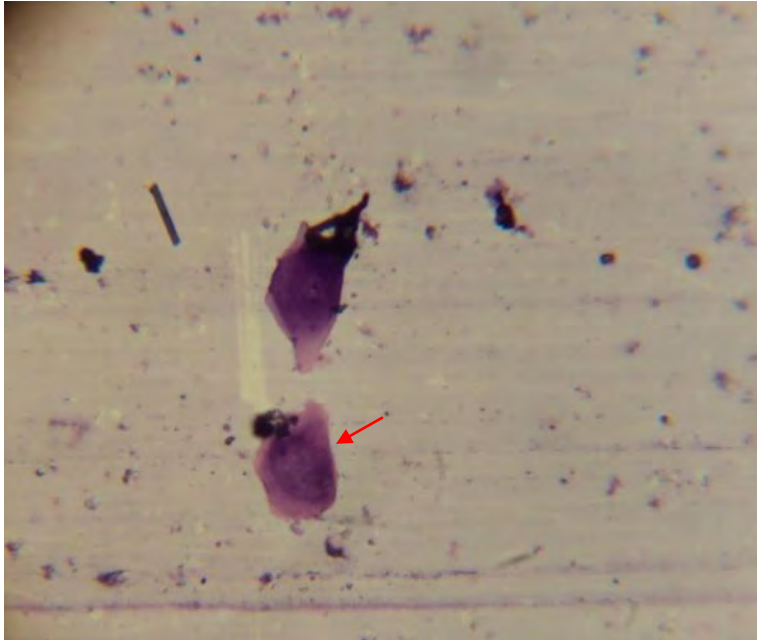


Imagen 28. Sedimento urinario donde la flecha roja señala una célula epitelial atípica de citoplasma levemente basófilo y de gran tamaño nuclear, exfoliada del urotelio de una vaca con HVEB (Tinción Wright 40X).

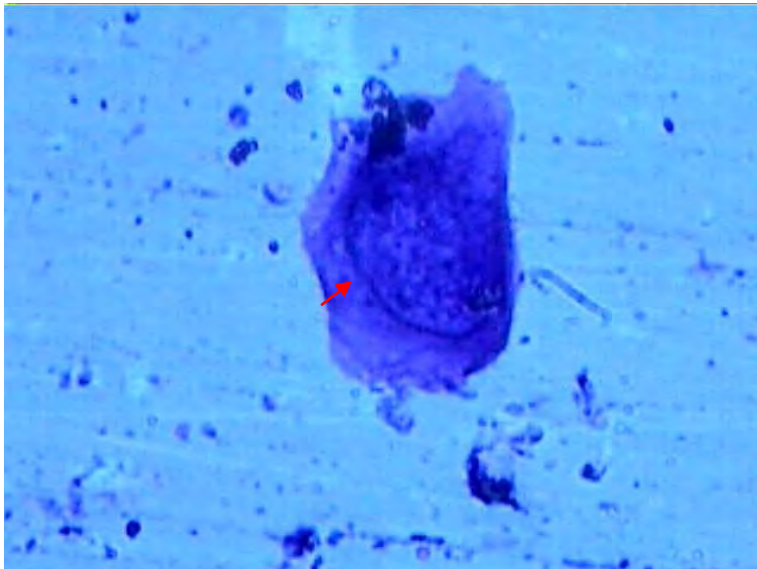


Imagen 29. Se aprecia con mayor detalle la célula de la imagen 28. Nótese la irregularidad nuclear (flecha roja) (Tinción Wright 100X).

Además del anterior hallazgo, se encontró que las muestras positivas a HVEB, presentaban una mayor cantidad de grupos de células exfoliadas de apariencia normal respecto a las muestras negativas y también presencia de glóbulos rojos maduros mayormente en escasa a leve cantidad.

4.2. Frecuencia de positividad a HVEB y tipos de células encontradas

De un total de 210 muestras, 64 de estas resultaron positivas a HVEB, con este resultado se comprobó que utilizando como método diagnostico la citooncología urinaria la frecuencia de presentación de la enfermedad en la población estudiada fue de 64 casos (30.47 %) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Frecuencia de diagnósticos de HVEB utilizando citooncología urinaria. Lima. 2010

	Cantidad de diagnósticos	Frecuencia de diagnósticos
Positivos	64	30.47 %
Negativos	146	69.53 %

Total de animales: 210

Por otro lado, también se pudo determinar el hallazgo único de células exfoliadas de tipo epitelial con características tumorales malignas en el total de la población evaluada (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Tipos celulares a evaluar en un estudio citooncológico.
Lima. 2010**

Tipo celular	Normal	Benigna	Maligna
Epitelial	146	0	64
Mesénquimal	0	0	0

Total de animales: 210

Además quedó manifiesto el hallazgo de glóbulos rojos en las muestras diagnosticadas positivas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Presencia de glóbulos rojos en las muestras diagnosticadas positivas a HVEB mediante citooncolología urinaria. Lima. 2010

Presencia de glóbulos rojos	Cero	Escaso	Leve	Moderado	Severo
Número de casos	9	28	18	7	2

Total de animales positivos: 64

V. DISCUSIÓN

La evaluación citooncológica del sedimento urinario es considerada importante en el estudio de muchas de las patologías vesicales de la especie humana (De Agustin *et al.*, 2005; García *et al.*, 2008) y también de la canina (Cowell, 1999). Describiéndola como esencial por encima de estudios citoscópicos y biopsicos en el diagnóstico de carcinomas uroteliales en ambas especies.

Si bien, la vejiga urinaria es considerada un órgano evaluable mediante urocitoanálisis, en el proceso diagnostico de muchas de sus patologías tanto en Medicina Humana (Aguilera *et al.*, 2005; De Agustín *et al.*, 2005; García *et al.*, 2008) como en Medicina Veterinaria (Cowell, 1999; Rebard, 1978). Resulta contradictorio el hecho que sean escasos los trabajos y referencias sobre la utilización de este método diagnóstico en medicina veterinaria de animales mayores (Radostis *et al.*, 2002; Sánchez-Villalobos, 2006). Partiendo de tales circunstancias y en razón que no fueron encontrados antecedentes hemerográficos ni bibliográficos sobre la utilización de técnicas citooncológicas urinarias en la HVEB, se considera en consecuencia, al presente cómo el primer reporte donde la evaluación citooncológica urinaria permite el diagnostico de dicha enfermedad.

La especial presencia de células atípicas de características neoplásicas en extendidos citológicos es un hallazgo contundente para afirmar de que un proceso neoplásico se está desarrollando en el organismo y a nivel del tejido o de los tejidos sometidos a estudio al realizar la toma de muestra (Rebard, 1978). Partiendo de aquí, la citooncología urinaria debería ser considerada una prueba especial en el diagnóstico de procesos neoplásicos a nivel vesical en la especie bovina. El único proceso con estas características es la enfermedad conocida como HVEB (Radostis *et al.*, 2002; Gonzales *et al.*, 2003) por lo que se hace aun mas especial la relación diagnóstica entre la citooncología urinaria y la HVEB.

El método diagnóstico descrito en este trabajo tiene la propiedad contundente de identificar células con marcado incremento pato-oncológico de la relación núcleo/citoplasma. Además permite el hallazgo de los siguientes criterios celulares de malignidad: arreglo cromatínico denso y membrana nuclear irregular. Permitiendo así la diferenciación entre neoplasias benignas y malignas. También nos permite determinar la orientación blastodérmica celular y diferenciar así células de origen epitelial y células de origen mesenquimal. Se demuestra que la técnica es ventajosa en algunos aspectos sobre otras como por ejemplo la tinción Papanicolao (Cowell, 1999), la cual a pesar de proporcionar mayor detalle del núcleo y del nucléolo celular, importantes características para el diagnóstico citopatológico, resultaría de todos modos más compleja y costosa de realizar. Se concluye entonces que la metodología descrita aquí es una fuerte opción si se quisiera implementar como método de diagnóstico de campo para HVEB.

Se ha descrito también la ultrasonografía (Sandoval *et al.*, 2002) y el uroanálisis (Herencia, 2009) como métodos diagnósticos de HVEB, los cuales han identificado animales positivos a la enfermedad basándose en hallazgos compatibles con procesos neoplásicos vesicales: conteo de glóbulos rojos, cambio de coloración de la tira reactiva urinaria en el parámetro sangre y hallazgo de lesiones papilares y/o erosivas hipo y/o anecoicas. De todas formas, estos hallazgos no son contundentes en el diagnóstico de procesos neoplásicos, por lo que frente a la imagen citológica que muestra características contundentes de naturaleza oncológica celular obtenida por el método de citooncología urinaria descrito en este trabajo, se esperaría un mayor porcentaje de identificación de animales verdaderamente positivos a HVEB con este método frente a la ultrasonografía y al uroanálisis.

No existen estudios que relacionen el diagnóstico de HVEB con cistoscopia y/o estudio de biopsia vesical, sin embargo en Medicina Humana la utilización de estas 2 técnicas si se describen en el estudio para diagnóstico de neoplasias vesicales, mencionándose que por citoncología urinaria se diagnosticó como verdaderos positivos individuos que al estudio biopsial y cistoscópico resultaron negativos. Quedando manifiesto que la probabilidad de realizar una inadecuada toma de muestra biopsial o no llegar a observar tejidos aparentemente tumorales en un individuo con neoplasia vesical es mayor que la de no encontrar por citología células atípicas descamadas en el mismo (García, 2008).

El diagnóstico definitivo de la HVEB se logra mediante necropsia e histopatología (Radostis *et al.*, 2002), por lo que esta última es la prueba estándar de "oro" para esta enfermedad, sin embargo el hecho de tener que sacrificar o esperar la muerte natural del animal para realizar el diagnóstico ha influenciado en los investigadores a buscar otras metodologías diagnósticas válidas para HVEB y posibles de realizar en animales vivos con enfermedad clínica o subclínica. Sanchez-Villalobos (2006) se refiere a la obtención de un diagnóstico ante mortem de mayor validez y seguridad para HVEB cuando se realizan mayor cantidad de pruebas diagnósticas (examen clínico, uroanálisis, ecografía, encuesta epidemiológica, etc) al mismo tiempo sobre un individuo. En el presente estudio se logró identificar células neoplásicas en 64 casos (30.47% de la población estudiada), debido a esto y por tratarse de un método simple, rápido, no invasivo ni estresante para el animal, la citoncología urinaria podría ser considerado un método de diagnóstico precoz para HVEB, siendo una alternativa al igual que la tira reactiva urinaria (Herencia, 2009), microscopia urinaria (Herencia, 2009) y evaluación anatomopatológica vesical (Gonzales *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que, a pesar de los buenos resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a frecuencia, muchas muestras estudiadas evidenciaron excesiva coloración al momento de su inspección microscópica, enmascarando así cambios a nivel celular y citoplasmático. Además los medios con pH alcalino como la orina bovina modifican la citoarquitectura (Osborne *et al.* 1978) y se presume que estos hechos estarían afectando directamente la cantidad de animales falsos negativos dentro del grupo en estudio diagnosticados por citooncología urinaria. Es probable también que el traslado de las muestras fijadas hasta la ciudad de Lima hiciera que pasara mayor tiempo hasta colorearlas y esto afectaría la calidad de la muestra. La utilización de metanol para el fijado de las muestras podría considerarse como una opción que confiera mejor calidad de la misma al momento de colorearla. La orina normalmente presenta baja concentración celular y poco contenido de proteínas por lo que se debería probar si con tiempos menores de coloración o con otras coloraciones tipo Romanowsky (T-15, Diff-Quik, Giemsa) o tinción Papanicolaou se incrementa significativamente la cantidad de muestras diagnosticadas como positivas en estudios citooncológicos urinarios de HVEB.

La frecuencia de vacas positivas a HVEB obtenida en este estudio es un aporte más a lo afirmado anteriormente por Gonzales *et al.* (2003) y Herencia (2009) respecto a la marcada y extendida presencia y desarrollo de esta enfermedad en la zona ganadera de Oxapampa (Pasco). Lo que resulta sumamente negativo para el desarrollo de la ganadería lechera en la zona y peligroso para la salud de la comunidad. La citooncología urinaria como técnica diagnóstica de HVEB podría convertirse en el método de monitoreo y control de la enfermedad en la zona, debido según lo expuesto en este trabajo a su mayor habilidad en la detección de positivos sobre otras pruebas, su bajo costo, sencillo y rápido proceder, su carácter no invasivo que minimiza la posibilidad de producir mayor estrés ni efectos secundarios sobre la salud del animal. Y además, se puede realizar en campo, evaluando así animales en distintas etapas de enfermedad e incluir aquellos que son beneficiados fuera del camal.

VI. CONCLUSIONES

La frecuencia de muestras positivas en la población estudiada con la citooncología urinaria fue de 30.47 % (64 casos). Valor que confiere a la citooncología urinaria buena capacidad de discriminación en el diagnóstico de HVEB.

La prueba de citooncología urinaria es efectiva como ayuda diagnóstica en la detección de animales positivos a HVEB, por lo que la determinación de sus valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y coeficientes de verosimilitud, apoyarían esta técnica frente a otras como prueba estándar de "oro" de campo para HVEB.

Como metodología diagnóstica de campo la citooncología urinaria no resulta compleja ni costosa de realizar, por lo que el proceso completo podría efectuarse en el mismo lugar donde habitan los animales sometidos a evaluación.

La citooncología urinaria, por ser una técnica no invasiva no compromete la vida del animal, no produce estrés y no propicia la aparición de efectos secundarios sobre la salud. Pudiendo utilizarse entonces en la determinación de hatos, establos y/o regiones afectadas por HVEB. Siendo aplicable también en estudios de monitoreo de la enfermedad, estudios de impacto sobre la producción lechera y/o estudios de intoxicación carcinogénica humana por consumo de lácteos provenientes de vacas con HVEB.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar otros estudios citooncológicos comparativos con otras técnicas de coloración tipo Romanowsky en muestras de orina de vacas en riesgo de padecer HVEB, con la idea de comparar los hallazgos citológicos y definir que técnica es más efectiva para el diagnóstico de la enfermedad.
- Realizar estudios utilizando la citooncología urinaria para determinar prevalencias de HVEB en las zonas o regiones donde se desarrolla ganadería extensiva o semiextensiva sobre pastos con presencia de Pa.
- Se debe incentivar estudios sobre HVEB en la zona de Oxapampa en cuanto a distribución, comportamiento, incidencia y prevalencia, además medir el impacto económico real sobre la producción bovina y comprobar su relación directa a la presentación de cáncer humano en la zona. Para lo cual se debería trabajar conjuntamente y con el apoyo de instituciones relacionadas al tema como el Ministerio de Agricultura y el Ministerio de Salud.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. **Abbas S, Lichtman A, Pober J. 2002.** Inmunología antitumoral. En: Abbas S., Lichtman A., Pober J. Inmunología celular y molecular. 4a ed. Madrid: Mc Graw-Hill. p 398-418.
2. **Aguilera C, Gutierrez JL, Antolin F. 2005.** Estudio comparativo entre cistoscopia, citología urinaria, NMP-22 y un nuevo método, bladder chek, en el seguimiento del cáncer vesical superficial. Actas Urol Esp. vol.29, no.3, p 252-256. ISSN 0210-4806.
3. **Albujar P. 2001.** Reseña histórica de la citología diagnóstica. Ginecología y Obstetricia. Sociedad Peruana de Obstetricia y Ginecología - Vol 47, N°2.
4. **Alonso- Amelot ME, Avendaño M. 2001.** Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela: An epidemiologic study. International Journal of Cancer 91(2): 252-259.
5. **Alonso-Amelot ME, Avendaño M. 2002.** Human carcinogenesis and bracken fern: a review of the evidence. Current medicinal chemistry. 9(6): 675-686.
6. **Alonso-Amelot ME. 1999.** Helecho macho, salud animal y salud humana. Rev Fac Agron LUZ (Venezuela). 16(5): 528-547.
7. **Alonso-Amelot ME, Castillo U, Smith BL, Lauren DR. 1996.** Bracken ptaquiloside in milk. Nature. 382.
8. **Alonso-Amelot ME, Castillo U, Jongh F. 1993.** On the passage of the Bracken fern carcinogen, ptaquiloside into bovine milk. Le Lait 73: 323-332.
9. **Baud E, Catilina P, Boiteux J-P, Bignon Y-J. 1998.** Human bladder cancers and normal bladder mucosa present the same hot spot of heterozygous chromosome-9 deletion. Int J Cancer 77: 821-824.
10. **Benjamin M. 1984.** Manual de patología clínica en veterinaria. México: Editorial Limusa. p 33-47.

11. **Blood DC y Radostits DM. 1992.** Medicina veterinaria. 7a ed. México: Interamericana-McGraw-Hill. p 1421-1424, 1065-1066.

12. **Borzacchiello G, Iovane G, Marcante ML, Poggiali F, Roperto F, Roperto S, Venuti A. 2003.** Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring bladder tumours in cows. Journal of General Virology 84: 2921-2926.

13. **Borzacchiello G, Resendes AR, Roperto S, Roperto F. 2009.** Co-expression of bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring carcinomas of the urinary bladder in cattle. J Comp Path 141: 84-88.

14. **Boyland E, Gasson JE, Williams DC. 1957.** Enzyme activity in relation to cancer. The urinary B-glucuronidase activity of patients suffering from malignant disease. Brit J Cancer 11: 120-129.

15. **Campo MS. 1997.** Papillomas and cancer in cattle. Cancer Surv. 6(1):39-54.

16. **Campo MS, O'Neil BW, Barron RJ, Jarrett WK. 1994.** Experimental reproduction of the papiloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. Carcinogenesis 15: 1597-1601.

17. **Carvalho T, Pinto C, Peleteiro MC. 2006.** Urinary bladder lesions in bovine enzootic hematuria. J Comp Pathol 134: 336-346.

18. **Cohen SM, Ellwein LB. 1990.** Proliferative and genotoxic cellular effects in 2-acetylaminofluorene bladder and liver carcinogenesis: biological modelinf of the ED01 study. Toxicol Appl Pharmacol 104: 79-93.

19. **Cohen SM, Ohnishi T, Clark NM, He J, Arnold LL. 2007.** Investigations of rodent urinary bladder carcinogens: collection, processing, and evaluation of urine and bladders. Toxicologic Pathology 35: 337-347.

20. **Cordon-Cardo C. 1998.** Molecular alterations in bladder cancer. Cancer Surv 32: 115-131.

21. **Cowell, R. 1999.** Citología y Hematología Diagnostica en el Perro y el Gato. 2a ed. España: Editorial Multimédica. p 8-16, 211-228.
22. **De Agustín D, Rodríguez K, Sáez M, Ramírez J, Hernández A, Menchero S. 2005.** Citología de orina: comparación de método ThinPrep con el método convencional de centrifugado-extensión. 7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. España. Disponible en: <http://www.conganat.org/7congreso/PDF/507.pdf>
23. **Dobereiner J, Tokarnia CH, Canella CF. 1967.** Ocurrance of enzootic haematuria and epidermoid carcinoma of the upper digestive tract of cattle in Brazil. Pesq Agropec Brasil 2: 489-504.
24. **Dyer AF. 1989.** Does Bracken spread by spores? In: Thomson JA, Smith RT. eds. Bracken biology and management. Sydney: Australian Institute of agriculture science. 35 – 42.
25. **Evans IA. 1968.** The Radiomimetric nature of bracken Toxin. In: Cancer Res 28: 2252-2261.
26. **Evans WC. 1976.** Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. Bot J Linnean Soc 73: 113-131.
27. **Evans IA, Humphreys DJ, Goulden L, Thomas AJ, Evans WC. 1963.** Effects of bracken rhizomes on the pig. J Comp Pathol Therap 73(3): 229-243.
28. **Fenner F, Bachman P, Gibbs P, Murphy F, White W. 1992.** Virología veterinaria. 2a ed. España: Editorial Acribia. p 336 – 337.
29. **Fernandez P. 1996.** Determinación del tamaño muestral. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Cad Aten Primaria; 3: 138-141.

30. **García MA, Fernández E, Martín MC, García S, Álvarez-Argüelles H. 2008.** Utilidad de la citología de orina para el diagnóstico del carcinoma vesical: estudio comparativo con biopsia. *Actas Urológicas Españolas*. 32(9):904-907. Esp. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0210-48062008000900007&script=sci_arttext
31. **González C, Chavera A, Perales R, Falcón N, Evaristo R. 2003.** Caracterización de las Lesiones Encontradas en Bovinos con Hematuria Vesical Enzoótica Bovina en la Zona de Oxapampa, Pasco. [Internet], [10 diciembre 2008]. Disponible en: http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/veterinaria/Vol15_N1/pdf/a04.pdf
32. **Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. 1999.** Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasia of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 154: 721-727.
33. **Herencia K. 2009.** Prevalencia de hematuria vesical enzoótica bovina mediante uroanálisis en el distrito de Chontabamba–Oxapampa-Pasco. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 23 p.
34. **Hirono I, Fushimi K, Mori H, Miwa T, Haga M. 1973.** Comparative study of carcinogenic activity in each part of bracken. *J Nat Cancer Institute* 50: 1367-1371.
35. **Hirono I, Kiyoyuki Y, Haruki N, Yoshikazu S, Makoto O, Shigetoshi H, Taketo Y, Kazumasa W, Hideo K, Kenji N, Youichi U. 1984.** Separation of Carcinogenic Fraction of Bracken Fern. *Cancer Lett* 21: 239-246.
36. **Hopman AH, Kamps MA, Speel EJ, Schapers RF, Sauter G, Ramaekers FC. 2002.** Identification of Chromosome 9 alterations and p53 accumulation in Isolated Carcinoma in Situ of the Urinary Bladder versus Carcinoma in Situ associated with carcinoma. *American Journal of Pathology Switzerland* 161(4) 1119-1125.
37. **Kastan MB, Bartek J. 2004.** Cell-cycle checkpoints and cáncer. *Nature* 432: 316-323.
38. **Koss LG. 1992.** Aspiration Biopsy. Cytological Interpretation and Histologic Base. 2^{da} edición, New York. pp5-6.

39. **Lioi MB, Barbieri R, Borzacchiello G, Dezzi S, Roperto S, Santoro A, Russo V, Roperto F. 2004.** Chromosome aberration in cattle with chronic enzootic haematuria. *J Comp Path* 113: 233-236.
40. **Marrero E, Bulnes C, Sánchez LM, Palenzuela I, Stuart R, Jacobs F, Romero R. 2001.** *Pteridium aquilinum* (bracken fern) toxicity in cattle in the humid chaco of Tarija, Bolivia. *Vet Hum Toxicol.* 43(3):156-158.
41. **Marliere CA, Santos RC, Galvao MA, Soares JF, Evangelista CL, Gomes RF. 1998.** Ingestión de brotes de samambaia y riesgo de cáncer de esófago y estómago en la región de Ouro Preto. *Revista Brasileña de Cancerología.* 44:3.
42. **Matoba M, Saito E, Saito K, Koyama K, Natori S, Matssshima T, Takimoto M. 1987.** Assay of ptaquiloside , the carcinogenic principle of bracken, *Pteridium aquilinum*, by mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis* 2: 419-425.
43. **Meuten DJ, Everitt J, Nskeep W, Jacobs RM, Peleteiro M, Thompson KJ. 2004.** Urinary bladder tumours. In: WHO Histological Classification of Tumours of the Urinary System of Domestic Animals, 2nd series, Vol. XI F.Y. Schulman, Ed., Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC: 26-37.
44. **Minnassian H, Schinella R, Reilly JC. 1994.** Polyomavirus in the urine: Follow up study. *Diagn Cytopathol* 10:209-211.
45. **Molina R, Millan JM, Oltra JS. 2003.** Análisis de microsatélites en células exfoliadas del sedimento urinario: Su utilidad para la detección del cáncer vesical. Estudio comparativo con citología urinaria. *Actas Urol Esp.* vol. 27, no. 8: 618-628. [Internet], [12 diciembre 2008]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062003000800007&lng=es&nrm=iso. ISSN 0210-4806.
46. **Moulton JE. 1990.** Tumors of the urinary system. In: Moulton JE. Tumors in domestic animals. 3th ed. University of California Press, London, UK. p 289-306.

47. **Muñoz N, Plummer M, Vivas J, Moreno V, De San Jose S, López G, Oliver W. 2000.** A case control study of gastric cancer in Venezuela. *Int J Cancer* 93: 417-423.
48. **Nagorny SV, Iimulog MA, Tisbul EA, Ole EB, Tidgen VP. 1999.** The Study of ecology-induced pathologies in regions and settlements (analytical review). *Med Tr Prom Ekol* HD(2): 26-31.
49. **Niwa H, Ojiva M, Wakamatsu K, Yamada K, Ohba S, Saito Y, Hirono I, Matsushita K. 1983.** Stereochemistry of ptaquiloside, a novel norsesquiterpene glucoside from bracken, *Pteridium aquilinum* var *latiusculum*. *Tetrahedron Lett.* 24: 5371-5372.
50. **Ojika M, Sugimoto K, Yamada K. 1989.** Modification and cleavage of DNA by Ptaquiloside. A new potent carcinogen isolated from Bracken fern. *J Chem Soc (Chem Commun)* 1775-1777.
51. **Ojika M, Wakamatsu K, Niwa H, Yamada K. 1987.** Ptaquilosido, a potent carcinogen isolated from Bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*: structure, elucidation based on chemical and spectral evidence, and reactions with amino acids, nucleosides and nucleotides. *Tetrahedron* 43: 5261-5274.
52. **Oliveira A, Furlan MS, Sakai M, Fukumasu H, Machado I, Haraguchi M, Lima S. 2009.** Immunomodulatory effects on *Pteridium aquilinum* on natural killer activity and select aspects of the cellular immune response of mice. *Journal of Immunotoxicology* 6(2): 104-114.
53. **Osborne C, Low D, Finco D. 1972.** Canine and Feline Urology. USA. WB Saunders Company. 417 pp.
54. **Page CN. 1976.** The taxonomy and phytogeography of bracken - a review. *Bot J Linn Soc* 73: 1 – 34.

55. **Pamukcu AM, Olson C, Price JM. 1966.** Assay of fractions of bovine urine for carcinogenic activity after feeding bracken fern (*Pteris aquilinum*). *Cancer Res.* 26(1):1745-1753.
56. **Pamukcu AM. 1974.** Tumours of the urinary bladder. In: *International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals*. Bull Wld Hlth Org. Vol. 50, Cap. 4. World Health Organization, Geneva (Switzerland).
57. **Pamukcu AM, Price JM. 1969.** Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). In: *J Natl Cancer Inst* 43: 275-279.
58. **Pamukcu AM, Erturk E, Price JM, Bryan GT. 1972.** Lymphatic Leukemia and Pulmonary Tumors in Female Swiss Mice Fed Bracken Fern (*Pteris aquiline*). *Cancer research* 35, 1442-1445.
59. **Pamukcu AM, Price JM, Bryan GT. 1976.** Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumors. Clinical and morphological characteristics. *Veterinary pathology* 13(2):110-22.
60. **Pamukcu AM, Ertuk E, Yalciner S, Milli S, Bryan GT. 1978.** Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research.* 38: 1556-1560.
61. **Pamukcu AM, Gorsay SR, Price JM. 1967.** Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows, en: *Cancer Res* 27 (part 1): 917-924.
62. **Peauroi JR, Mohr F, Fisher D, Misheff M, Grindey J, Campo S. 1995.** Anemia Haematuria multicentric Urinary neoplasia in a Llama (*Lama glama*) exposed to bracken fern. *J Zoo and Wildlife Medicine* 26: 315-320.
63. **Peretti V, Ciotola F, Albarella S, Russo V, Di Meo GP, Iannuzzi L, Roperto F, Barbieri V. 2007.** Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic haematuria. *Mutagenesis* 22(5) 317- 320.

64. **Potter DM y Baird MS. 2000.** Carcinogenic effects of ptaquiloside in Bracken Fern and related compounds. Br J Cancer 83: 914-920.
65. **Prakash AS, Pereira TN, Smith BL, Shaw G, Seawright AA. 1996.** Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. Nat Toxins 4: 221-222.
66. **Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002.** Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9a ed. Madrid: McGraw-Hill–Interamericana. p 1534, 1971-1974.
67. **Rebard A. 1978.** Handbook of veterinary cytology. USA. Ralston Purina Company. p 59.
68. **Saito K, Nagao T, Matoba M, Koyama K, Natori S, Murakami T, Saiki Y. 1989.** Chemical assay of ptaquiloside, the carcinogen of *Pteridium aquilinum*, and the distribution of related compounds in the pteridaceae. Phytochemistry 28: 1605-1611.
69. **Sanchez-Villalobos A. Arraga CM. Villarroel-Neri R. 2006.** Validez, seguridad y cociente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de hematuria enzoótica bovina. RC, vol.16, no.6: p 604-612. ISSN 0798-2259.
70. **Sanchez A, Villarroel R, Pino D, García D, Molero G, Carrasco D. 2003.** Evaluación comparativa de diferentes métodos del control de la hematuria enzootica bovina.
71. **Sanchez-Villalobos AJ. 2006.** Hematuria enzootica bovina. Ediciones Grafifor c.a. Maracaibo, Venezuela. 190pp.
72. **Sandoval j, Sánchez A, Disney R, Villarroel R, Alvarado M, García D. 2002.** Estudio Ultrasonográfico de la Vejiga Urinaria en la Hematuria Enzoótica Bovina. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XII, N°5, 346-350. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27691/2/articulo3.pdf>.

73. **Santos RC, Brasileiro FG, Silva ME. 1992.** Tumorigenicity of boilin water extract of Bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Khun). *Cienc Tecnol Aliment* 12(1): 72-76.
74. **Sardon D, De la Fuente I, Calonge E, Perez-Alenza M, Castaño M, Dunner S, Peña L. 2005.** H-ras immunohistochemical expression and molecular analysis of urinary bladder lesions in grazing adult cattle exposed to bracken fern. *J Comp Pathol* 132: 195-201.
75. **Schneider L. 2004.** Invasive species and common property: the case of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L) Kuhn) invasion in the region of Calakmul. Post doctoral Research associate. Brown University. 21 p.
76. **Shahin M, Smith BL, Prakash AS. 1999.** Bracken carcinogens in the human diet. *Mutation Research* 443, 69-79.
77. **Sim y Se, Povey AC, Ward TH, Margison GP, Sheffieldd ES. 2000.** Fern spore extracts can damage DNA. *Br J Cancer* 83 (1): 69-73.
78. **Smith BL. 1997.** The toxicity of Bracken Fern (Genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. In: Felix D' Mello, J. P. (ed.) *Handbook of plant and fungal toxicants*. CRC Press, Boca Raton, FL. 63-76.
79. **Smith BL, Lauren DL, Prakash AS. 1999.** Bracken fern (*Pteridium*): toxicity in animal and human health. Bracken fern: toxicity, biology and control. International Bracken Group Conference 76 – 85.
80. **Tizard I. 2000.** Resistencia a tumores. En: Tizard ed. *Inmunología veterinaria*. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill. p 319-331.
81. **Tokarnia CH y Dobereiner J. 2000.** Plantas de ação radiomimetica. En: plantas toxicas do brasil. 178-185.

82. **Van der Hoeven JC, Lagerweij WJ, Posthumus MA, Van Veldhuizen A, Holterman HA 1983.** Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from Bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Carcinogenesis* 4: 1587-1590.
83. **Varela S. 2005.** Citología cervical. *Rev Med Hondur*; 73:131-136. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RMH75/pdf/2005/pdf/Vol73-3-2005-7.pdf>.
84. **Villalobos-Salazar J. 1985.** Carcinogenicidad del *Pteridium aquilinum* y alta incidencia del cáncer gástrico en Costa Rica. *Rev Cost Cienc Med* 6: 131-139.
85. **Villalobos J, Meneses A, Salas J. 1990.** Carcinogenic effects in mice of milk from cows fed on bracken fern *Pteridium aquilinum*, in: Thomson J.A.; Smith R.T. (Eds). *Bracken, biology and management*. Institute of Agricultural Science Occasional publication N°40. Sydney Australia 247-251.
86. **Villanova PA. 1992.** National Committee for Clinical Laboratory Standards: Routine Analysis and Collection, transportation and preservation of urine specimens, tentative guidelines: 12, GP16-T, 9.
87. **Wiesner E. 1973.** Enfermedades del ganado bovino. 1a ed. Zaragoza: Acribia. 207 p.
88. **Wagner U, Sauter G, Moch H, Novotna H, Epper R, Mihatsch M, Waldman F. 1995.** Patterns of p53, erbB-2, and EGF-r expression in premalignant lesions of the urinary bladder. *Hum Pathol* 26: 970-978.
89. **Wynn J, Small J, Pakeman R, Sheffield E. 2000.** An assessment of genetic and environmental effects on sporangial development in Bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) using a novel quantitative method. *Annals of Botany UK* 85 (Supplement B): 113-115.

Anexo 1

Total de animales muestreados, animales positivos a Hematuria Vesical
Enzoótica Bovina y frecuencia de positividad. Lima. 2010.

animal	Positivo
1	+
2	+
3	
4	+
5	
6	+
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	+
21	
22	
23	
24	
25	
26	+
27	+
28	
29	
30	
31	
32	+
33	+
34	
35	
36	
37	
38	
39	+
40	
41	
42	
43	
44	
45	

46	
47	
48	+
49	
50	
51	
52	+
53	+
54	+
55	
56	
57	+
58	+
59	+
60	
61	+
62	+
63	
64	+
65	+
66	
67	+
68	
69	+
70	
71	+
72	
73	
74	
75	
76	+
77	
78	
79	
80	
81	+
82	+
83	
84	
85	+
86	+
87	+
88	
89	+
90	
91	

92	+
93	+
94	+
95	
96	+
97	+
98	+
99	+
100	+
101	
102	
103	
104	
105	
106	
107	
108	+
109	
110	
111	+
112	
113	+
114	
115	
116	
117	
118	
119	+
120	
121	
122	
123	
124	
125	+
126	
127	
128	
129	+
130	
131	+
132	+
133	
134	
135	+
136	
137	

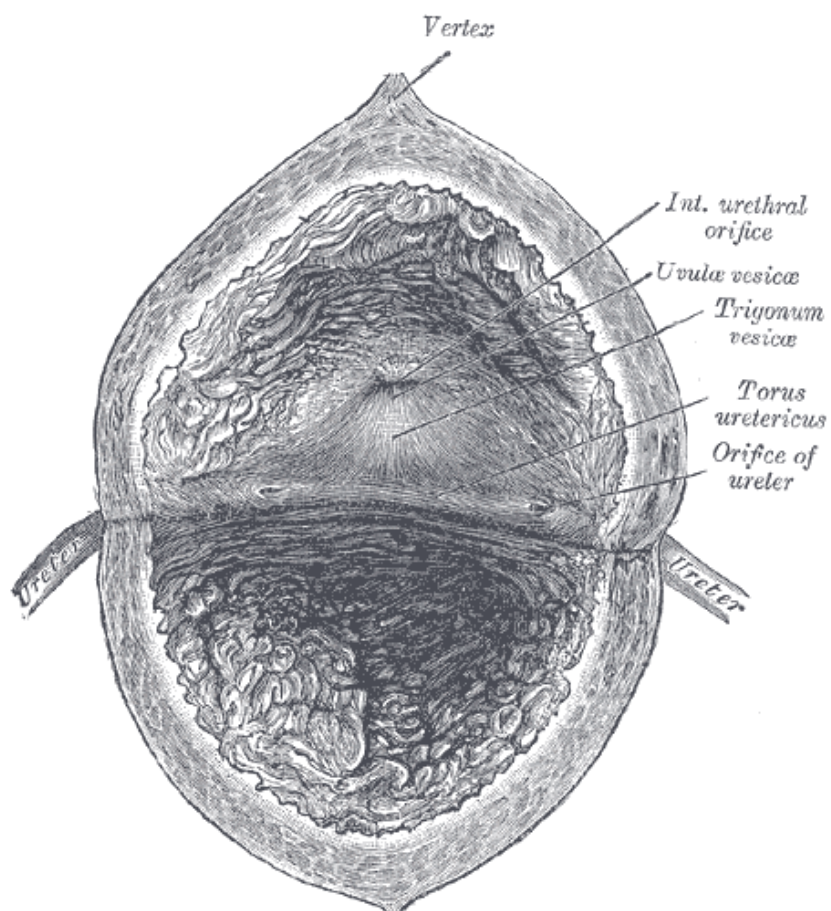
138	
139	+
140	+
141	
142	+
143	
144	
145	
146	
147	
148	
149	
150	
151	
152	
153	
154	+
155	
156	
157	
158	
159	
160	
161	+
162	
163	+
164	
165	+
166	
167	
168	
169	
170	
171	
172	+
173	
174	
175	+
176	
177	+
178	+
179	
180	
181	
182	
183	

184	
185	
186	
187	
188	+
189	
190	
191	+
192	
193	
194	
195	
196	
197	+
198	
199	+
200	+
201	
202	
203	
204	
205	
206	
207	
208	
209	
210	
total	64(+)

*64 (30.4719 %) muestras son (+) a HVEB

Anexo 2

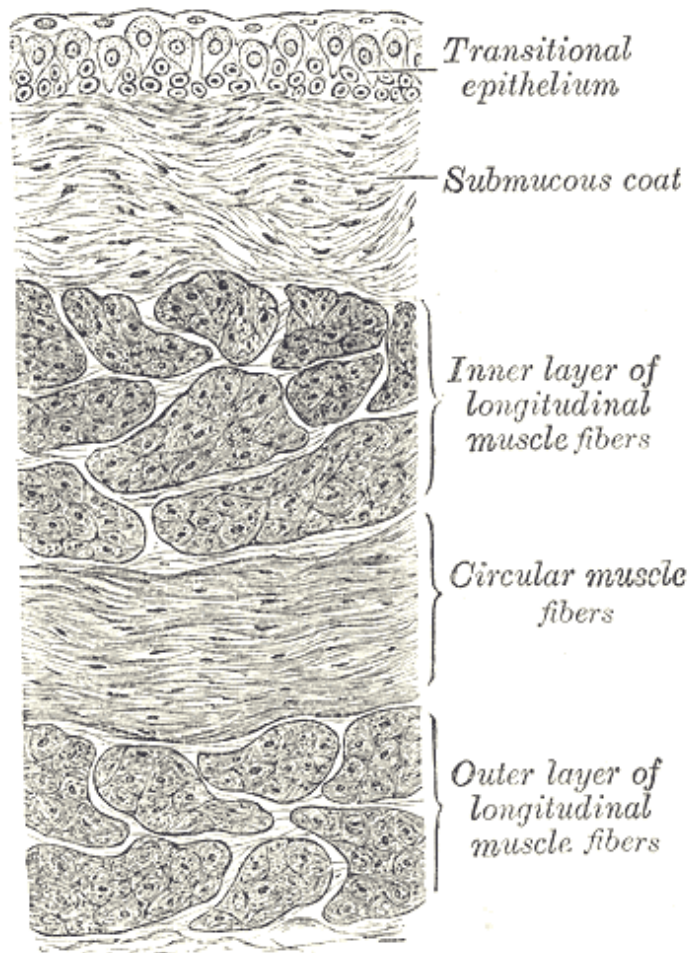
Estructura anatómica interior de la vejiga urinaria



Fuente: "Vejiga urinaria" Enciclopedia Microsoft® Encarta® Online 2008
<http://es.encarta.msn.com> © 1997-2008 Microsoft Corporation.

Anexo 3

Estructura histológica de la pared vesical urinaria



Fuente: "Vejiga urinaria" Enciclopedia Microsoft® Encarta® Online 2008
<http://es.encarta.msn.com> © 1997-2008 Microsoft Corporation.